

**FAM107A/DRR1/TU3A**

**Analysen zur Funktion eines Gens**

Inaugural-Dissertation

zur  
Erlangung des Doktorgrades  
Dr. rer. nat.

des Fachbereichs  
Biologie und Geographie  
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
Ursula Maria Jünemann

aus Münster

im September 2008

Die der vorliegenden Arbeit zu Grunde liegenden Experimente wurden am Institut Innere Klinik (Tumorforschung), Direktor Prof. Dr. med. S. Seeber, seit 01.10.2007 Prof. Dr. med. M. Schuler, der Universität Duisburg-Essen sowie im Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie, Direktor Prof. Dr. med. K. Reifenberger, seit 01.04.2006 Prof. Dr. med. R. M. Bohle, des Universitätsklinikums des Saarlandes durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Opalka

2. Gutachter: PD Dr. M. Wagner

3. Gutachter: Prof. Dr. H. Esche

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: PD Dr. J. Thomale

Tag der mündlichen Prüfung: 17.04.2009

*Für Ahmed Hamdy*

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	I
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	VI
<b>1 Einleitung</b>	1
<b>1.1 Tumorgenese</b>	1
1.1.1 Genetische Alterationen bei der Tumorgenese	1
1.1.2 Epigenetische Alterationen bei der Tumorgenese	4
<b>1.2 Das humane FAM107A</b>	5
1.2.1 Struktur des FAM107A-Gens und seiner Haupttranskripte	6
1.2.2 Das Proteinprodukt des FAM107A-Gens	7
1.2.3 Mögliche Funktionen von FAM107A (Stand der Forschung)	8
<b>1.3 Methodische Überlegungen</b>	10
1.3.1 Zellkultursysteme	10
1.3.2 <i>In-vitro</i> -Tumorigenitätsmarker	11
<b>1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit</b>	12
<b>2 Material und Methoden</b>	13
<b>2.1 Materialien</b>	13
2.1.1 Zelllinien	13
2.1.2 Gewebeproben	19
2.1.3 RNA-Proben	21
2.1.4 cDNA-Proben	22
2.1.5 Genomische DNA: Plazenta-DNA	25
2.1.6 Bakterienstämme E.coli (Tax-ID: 562)	25
2.1.7 Vektoren	25
2.1.8 Oligonukleotide	26
2.1.9 Chemikalien	27
2.1.10 Molekulargewichtstandards	27
2.1.11 Verwendete Puffer und Lösungen, Medien für die Zellkultur	28
2.1.12 Antikörper	29
2.1.13 Enzyme	29
2.1.14 Verwendete Kits	29
2.1.15 Verbrauchsmaterialien	30
2.1.16 Geräte	30
<b>2.2 Molekularbiologische Methoden</b>	32
2.2.1 Präparation genomischer DNA aus humanen Zelllinien	32



2.2.2	Fotometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren	32
2.2.3	DNA-Sequenzierung	33
2.2.4	RNA-Extraktion	33
2.2.5	DNase-Verdau der RNA-Präparate	33
2.2.6	Reverse Transkription (RT)	34
2.2.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
2.2.8	RT-PCR zum Nachweis der Expression von FAM107A-mRNA	35
2.2.9	Gelelektrophorese	36
2.2.10	Aufreinigung von PCR-Produkten und DNA-Banden aus Agarosegelen	36
2.2.11	Restriktionsverdau und Ligation	37
2.2.12	Transformation kompetenter Bakterienzellen	37
2.2.13	Übernachtskulturen und Glycerinkulturen	37
2.2.14	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien	38
2.2.14.1	„Mini“-Präparation („MiniPrep“)	38
2.2.14.2	„Maxi“-Präparation („MaxiPrep“)	38
2.2.15	Konstruktion der Vektoren, die FAM107A-cDNA enthalten	38
<b>2.3</b>	<b>Allgemeine Methoden der Zellkultur</b>	41
2.3.1	Passagieren/Expandieren von Zellen	41
2.3.2	Kryokonservieren von Zellen	41
2.3.3	Test auf Mykoplasmenkontamination	42
2.3.4	Bestimmen der Zellzahl	42
2.3.5	Etablierung FAM107A ektopisch stabil exprimierender Zelllinien	43
2.3.6	Fixieren und Permeabilisieren von Zellen für durchflusszytometrische Analysen	43
2.3.7	Durchflusszytometrie	44
<b>2.4</b>	<b>Genomische Analysen diverser Zelllinien</b>	45
2.4.1	Karyotypisierung	45
2.4.2	PCR-Analyse genomischer DNA	45
<b>2.5</b>	<b>Überprüfung der Expression von FAM107A-mRNA in Abhängigkeit von unterschiedlichen Einflussgrößen</b>	46
2.5.1	Expression von FAM107A in Abhängigkeit vom zirkadianen Rhythmus	46
2.5.2	Expression von FAM107A in Abhängigkeit vom Zellzyklus	46

2.5.3	Bestimmung des Einflusses der Konfluenz auf die Expression von FAM107A	47
2.5.4	Einfluss von erhöhter Temperatur („Hitzeschock“) auf die Expression von FAM107A	48
<b>2.6</b>	<b>Untersuchungen zur epigenetischen Beeinflussung der Expression von FAM107A-mRNA</b>	48
2.6.1	Behandlung von Zelllinien mit Decitabin	48
2.6.2	Behandlung von Zelllinien mit Trichostatin A, TSA	49
<b>2.7</b>	<b>Einfluss von Cisplatin auf die Expression von FAM107A</b>	49
<b>2.8</b>	<b>Charakterisierung FAM107A ektopisch überexprimierender Zelllinien</b>	50
2.8.1	Methoden zur Analyse der Proliferation	50
2.8.1.1	<i>Immunzytochemische Messung der Expression von Ki67</i>	50
2.8.1.2	<i>Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Ki67</i>	51
2.8.1.3	<i>Zellzyklusanalyse</i>	51
2.8.1.4	<i>Proliferationsanalyse durch <sup>3</sup>H-Thymidin Einbau</i>	51
2.8.1.5	<i>Proliferationskinetik</i>	51
2.8.2	<i>In-vitro-Tumorigenität FAM107A ektopisch überexprimierender Zelllinien</i>	52
2.8.2.1	<i>Kultivierung von Zellen in Weichagar</i>	52
2.8.2.2	<i>Messung der Survivin-Expression</i>	52
2.8.2.3	<i>Test auf Invasivitätsmarker mittels Zymografie</i>	53
2.8.3	Analyse der HLA-Expression	54
2.8.4	Behandlung der stabil transfizierten Zelllinien mit Cisplatin	54
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	55
<b>3.1</b>	<b>Zellkultursysteme</b>	55
3.1.1	Charakterisierung der Zelllinien	55
3.1.1.1	<i>Morphologie und Karyotypisierung</i>	55
3.1.1.2	<i>DNA-Fingerprinting-Analyse</i>	56
3.1.1.3	<i>Analyse möglicher genomischer Veränderungen</i>	57
3.1.2	Unterschiedliche Einflussgrößen auf Zellen, die in Zellkultur wachsen	58
3.1.2.1	<i>Expression von FAM107A-mRNA in Abhängigkeit vom Zellzyklus und zirkadianen Rhythmus</i>	58
3.1.2.2	<i>Einfluss der Konfluenz auf die Expression von FAM107A-mRNA</i>	63

3.1.2.3	<i>Einfluss der Temperatur auf die Zellproliferation und die Expression von FAM107A-mRNA</i>	65
<b>3.2</b>	<b>Analysen zur Expression von FAM107A-mRNA</b>	67
3.2.1	FAM107A-mRNA-Expression in Normalgewebeproben	67
3.2.2	FAM107A-mRNA-Expression in Tumorzelllinien und Tumorgewebeproben	69
3.2.2.1	<i>FAM107A-mRNA-Expression in Nierenzellkarzinomzelllinien, Melanom-, Bronchial- und Zervixkarzinomzelllinien</i>	69
3.2.2.2	<i>FAM107A-mRNA-Expression in Larynxkarzinomzelllinien, Oropharynxkarzinomzelllinien und -gewebeproben</i>	70
3.2.2.3	<i>FAM107A-mRNA-Expression in Retinoblastomzelllinien</i>	71
3.2.3	FAM107A-mRNA-Expression in virusinfizierten Zellen	72
<b>3.3</b>	<b>Untersuchungen zur epigenetischen Beeinflussung der Expression von FAM107A-mRNA</b>	73
3.3.1	Behandlung von Zelllinien mit 5-Aza-2'-desoxycytidin (Decitabin)	73
3.3.2	Behandlung von Zelllinien mit Trichostatin A (TSA)	75
<b>3.4</b>	<b>Analyse der FAM107A-mRNA-Expression nach Behandlung von Zelllinien mit Cisplatin</b>	77
<b>3.5</b>	<b>FAM107A ektoptisch exprimierende Zelllinien</b>	79
3.5.1	Etablierung FAM107A ektoptisch stabil exprimierender Zelllinien	79
3.5.1.1	<i>Konstruktion von FAM107A-cDNA-Vektoren</i>	79
3.5.1.2	<i>Etablierung FAM107A ektoptisch stabil exprimierender Zelllinien</i>	80
3.5.1.3	<i>Stabilität der FAM107A ektoptisch exprimierenden Zelllinien</i>	83
3.5.1.4	<i>Expression des Leervektors in den stabil transfizierten Zelllinien</i>	84
3.5.1.5	<i>Morphologie FAM107A ektoptisch exprimierender Zelllinien</i>	84
3.5.1.6	<i>Karyogramme FAM107A ektoptisch exprimierender Zelllinien</i>	86
3.5.2	Analysen zur Proliferation FAM107A ektoptisch exprimierender Zelllinien	87
3.5.2.1	<i>Proliferationsmessung mittels immunzytochemischer Analyse der Expression von Ki-67/Mib1-Antigen in den nativen und stabil transfizierten HTB-46-Zellen</i>	87
3.5.2.2	<i>Proliferationsmessung mittels durchflusszytometrischer Analyse der Expression von Ki-67/Mib1-Antigen in den nativen und stabil transfizierten Zelllinien</i>	88
3.5.2.3	<i>Zellzyklusanalyse</i>	89

3.5.2.4	Messung der DNA-Synthese durch $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbau	90
3.5.2.5	Proliferationskinetik der stabil transfizierten Zelllinien	92
3.5.3	Analyse von Tumorigenitätsmarkern in FAM107A-ORF ektopisch exprimierenden Zelllinien	94
3.5.3.1	Wachstum in Weichagarmedium	95
3.5.3.2	Expression von Survivin	98
3.5.3.3	Nachweis des Invasivitätsmarkers MMP-2 durch Zymografie	100
3.5.3.4	Expression der Oberflächenantigene HLA-DR und HLA-ABC	100
3.5.3.5	Einfluss der FAM107A-ORF-Expression auf die Sensitivität der RCC-1 bzw. HTB-46-Zellen gegenüber Cisplatin	101
4	Diskussion	104
4.1	Methodische Aspekte und Vorversuche	104
4.2	Expressionsanalysen	109
4.3	Genetische und epigenetische Analysen	113
4.4	Funktionale Analyse von Zelllinien am Beispiel FAM107A-ORF ektopisch exprimierender Zelllinien	115
4.5	Ausblick	123
5	Zusammenfassung	124
6	Tabellenverzeichnis	126
7	Abbildungsverzeichnis	127
8	Anhang	129
Anhang A:	Danksagung	129
Anhang B:	Literatur	131
Anhang C:	Tabellen 8.1-8.11	145
Anhang D:	Abbildungen 55-57	155
Anhang E:	Sequenzen	161
Anhang F:	Lebenslauf	174
Anhang G:	Erklärungen	175

## Abkürzungsverzeichnis

Für die Bedeutung der abgekürzten Gennamen siehe Tabelle 8.1, S.145f. bzw. NCBI, Entrez Gene (Maglott et al., 2005). Die Abkürzungen für die Virusbezeichnungen sind der Tabelle 8.6, S.150, zu entnehmen.

°C	Grad Celsius
%	Prozent
#	Kennzeichnung unterschiedlicher Zellkolonien
®	Amtlich registriertes Markenzeichen
A	Absorption
aa	<u>A</u> mino <u>a</u> cid, Aminosäuren
<i>Abb</i>	<u>A</u> bbildung
ABC-Methode	<u>A</u> vidin- <u>B</u> iotin- <u>K</u> omplex-Methode
Abk	<u>A</u> bkürzung
ADCA	<u>A</u> deno <u>c</u> arcinoma, Adenokarzinom
Amp (R)	Ampicillin Resistenzgen
ATCC	<u>A</u> merican <u>T</u> ype <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection
AUC	<u>A</u> rea <u>u</u> nder the <u>c</u> urve, Fläche unterhalb der Kurve
bp	<u>B</u> asen <u>p</u> aar/e
BGHpA	<u>B</u> ovine growth hormone <u>p</u> oly <u>a</u> denylation signal, Wachstumshormon-Polyadenylierungssignal (Rind)
blastn	Nucleotide blast, Computerprogramm NCBI (Wheeler et al., 2000)
BSA	<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin, Rinderserumalbumin
CAS-Nr	<u>C</u> hemical <u>A</u> bstrac <u>S</u> <u>S</u> ervice Number
CCD	Charge-coupled device
CDD	<u>C</u> onserved <u>D</u> omains <u>D</u> atabase
cDNA	<u>C</u> omplementary <u>D</u> N <u>A</u> , komplementäre DNA
CGH	<u>C</u> omparative gen <u>o</u> m <u>h</u> ybridization, Komparative Genomhybridisierung
cm	Zentimeter
CMV-Promotor	<u>C</u> ytomegalovirus promotor, Humaner Zytomegalievirus Promotor und Enhancer
cp	Composite karyotype, zusammengesetzter Karyotyp
cpm	<u>C</u> ounts <u>p</u> er <u>m</u> inute, gezählte Impulse pro Minute
D5	D5S818
D7	D7S820
D13	D13S317
D16	D16S539
DAB	3,3'- <u>D</u> iamino <u>b</u> enzidin
DAPI	4',6'- <u>D</u> iamidino-2-phenyl <u>i</u> ndol dihydrochlorid
Decitabin	5-Aza-2'-Desoxycytidin
del	<u>D</u> eletion
der	<u>d</u> erivatives Chromosom
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
DNA	<u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid, Desoxyribonukleinsäure
DNase I	<u>D</u> eoxyribo <u>n</u> uclease <u>I</u>
DSMZ	<u>DSMZ</u> GmbH AG MOLEKULARBIOLOGIE
DUF	<u>D</u> omain of <u>u</u> nknown <u>f</u> unction
E	Extinktion
EC	<u>E</u> nzyme <u>C</u> ommission number
EDTA	<u>E</u> thylene diamine <u>t</u> etraacetic acid, Ethylendiamintetra-essigsäure
EGFP	<u>E</u> nhanced green <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein
ESC	Human <u>e</u> mbryonic <u>s</u> tem <u>c</u> ells, humane embryonale Stammzellen
Exp.	Experiment
FACS	<u>F</u> luorescence <u>a</u> ctivated cell <u>s</u> orting
FAM107A-1,1-Vektor	pcDNA3.1Zeo(+) <u>FAM107A-1,1</u>

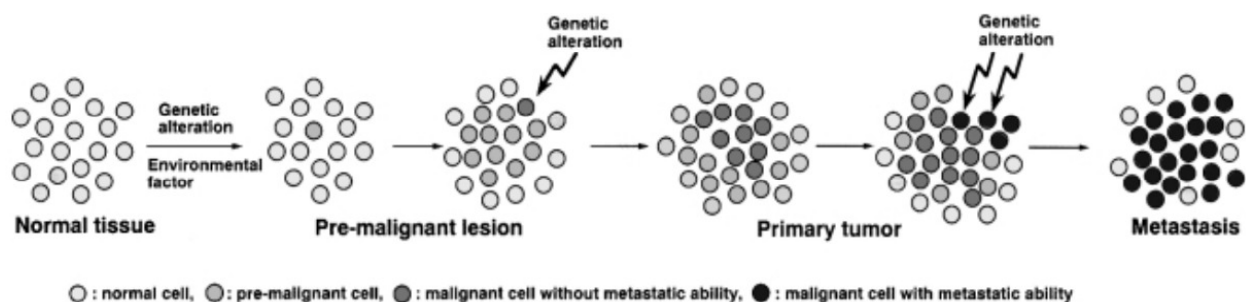
FAM107A-1,1-IRES-EGFP-Vektor	pcDNA3.1Zeo(+)-FAM107A-1,1-IRES-EGFP
FAM107A-ORF-Vektor	pcDNA3.1Zeo(+)-FAM107A-ORF
FAM107A-Volllänge	pcDNA3.1Zeo(+)-FAM107A-Volllänge
FCS	Fetal calf serum, fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FL1	Fluoreszenzlicht 1
FL3	Fluoreszenzlicht 3
GC	Guanin, Cytosin
GDP	Guanosin 5'-diphosphat
GDS	GEO DataSet, Datensatz der GEO Datenbank (Barrett et al., 2007)
G <sub>0</sub> -Phase	Ruhephase (Zellzyklus)
G <sub>1</sub> -Phase	Postmitotische Phase oder Präsynthesephase
Gene ID	Gene Identifikationsnummer nach (Wheeler et al., 2000)
GSM	GEO Sample, Probenbezeichnung für GEO Datasets (Barrett et al., 2007)
GTP	Guanosin 5'-triphosphat
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HFF	Human foreskin fibroblast, humane Vorhaut-Fibroblasten
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Committee
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma; Kopf- und Hals-Plattenepithelkarzinome
H08	Mit FAM107A-ORF-Vektor stabil transfizierte Zelllinie HTB-46, Kolonie 8
H011	Mit FAM107A-ORF-Vektor stabil transfizierte Zelllinie HTB-46, Kolonie 11
HTB-V	Mit dem Leervektor pcDNA3.1Zeo(+) stabil transfizierte Zelllinie HTB-46
IAP-Gene	Inhibitor of apoptosis, Apoptose-Inhibitor-Gene
ICD-O-3	International Classification of Diseases for Oncology, 3. Revision
IG Klasse	Immunglobulin Klasse
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosid
IRES	internal ribosomal entry site, interne ribosomale Eintrittsstelle
IRES-EGFP-Vektor	pcDNA3.1Zeo(+)-IRES-EGFP
JCRB	JAPANESE COLLECTION OF RESEARCH BIORESOURCES
Kan (R)	Kanamycin Resistenzgen
kb	Kilobasenpaare
kBq	kilo Becquerel (=0,027 µCi, mikroCurie)
KCl	Kaliumchlorid
kDA	Kilodalton
Ki67	Ki67/Mib1-Antigen
LD <sub>50</sub>	mittlere letale Dosis
Leervektor	Vektor pCDNA3.1ZEO(+)
LOH	Loss of heterozygosity, Verlust der Heterozygotie
LUCA-TSG-Region	Lung cancer Tumor Suppressor Gene Region
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
M-Phase	Mitose-Phase
MaxiPrep	Maxi-Präparation
Mb	Megabasenpaare
MHC	Major Histocompatibility Complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute/n
MiniPrep	Mini-Präparation
mg	Milligramm
mM	millimolar
MOI	Multiplicity of Infection
mRNA	Messenger RNA (Boten-RNA)

MW	<u>Mittelwert</u>
n	Anzahl der unterschiedlichen Ansätze eines Experimentes
NCI	<u>National Cancer Institute</u>
ng	<u>Nanogramm</u>
nm	<u>Nanometer</u>
NTP	<u>Nukleotid Triphosphat</u>
OD	<u>Optical density</u> , optische Dichte
ORF	<u>Open reading frame</u> , offener Leserahmen
p	<u>petit</u> , kurzer Chromosomenarm
p	Angabe der <u>Passagenzahl</u>
p.A.	<u>Pro Analyse</u>
PC5	Phycoerythrin mit kovalent gebundenem Cyanin 5
pmol	<u>Pikomol</u>
PBS	<u>Phosphate buffered saline</u> , Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<u>Polymerase chain reaction</u> , Polymerase-Kettenreaktion
pUC ori	<u>pUC origin</u>
P/S	Penicillin/Streptomycin
qRT-PCR	<u>Quantitative RT-PCR</u>
R03	Mit FAM107A-ORF-Vektor stabil transfizierte Zelllinie RCC-1, Kolonie 3
R012	Mit FAM107A-ORF-Vektor stabil transfizierte Zelllinie RCC-1, Kolonie 12
RCC-V	Mit dem Leervektor pcDNA3.1Zeo(+) stabil transfizierte Zelllinie RCC-1
RNA	<u>Ribonucleic acid</u> , Ribonukleinsäure
RPE	<u>Retinale Pigmentepithelzelllinie</u>
RT	<u>Raumtemperatur</u>
RT	<u>Reverse Transkription</u>
RT(+)	Probenbezeichnung für eine Probe der RT
RT(-)	Probenbezeichnung für Negativkontrolle der RT
RT-PCR	<u>Reverse-Transcriptase-Polymerase-Chain-Reaction</u>
S-Phase	<u>Synthese-Phase</u>
SCID	<u>Severe Combined Immunodeficiency</u> , schwerer kombinierter Immundefekt
SDS	<u>Sodium dodecyl sulfate</u> , Natriumdodecylsulfat
sec	Second, Sekunde
SQCA	<u>Squamous cell carcinoma</u> , squamöses Zellkarzinom
SSH	<u>suppressive Subtraktionshybridisierung</u>
STABW	<u>Standardabweichung</u>
STR	<u>Short Tandem Repeat</u>
SV40pA	<u>SV40 Polyadenylierungssignal</u>
T25-Flasche	Zellkultur-Flasche mit 25cm <sup>2</sup> Wachstumsfläche
T75-Flasche	Zellkultur-Flasche 75cm <sup>2</sup> Wachstumsfläche
Tab	Tabelle
TAE	<u>Tris-Azetat-EDTA</u>
Tax-ID	<u>Taxonomy Identifikationsnummer</u> (Wheeler et al., 2000)
TE-Puffer	<u>Tris-EDTA-Puffer</u>
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur
TRIS	<u>Tris(hydroxy-d-methyl)amino-d<sub>2</sub>-methan</u>
TSA	<u>Trichostatin A</u>
TSG	<u>Tumorsuppressorgen</u>
t <sub>g</sub>	Populationsverdopplungszeit
UCSC	<u>University of California, Santa Cruz</u>
U/min	<u>Umdrehungen pro Minute</u>
Unit	Enzyme <u>unit</u>
UV	<u>Ultraviolett</u>
w/v	<u>Weight/volume</u> , Gewicht/Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-beta-d-galactopyranosid
Zeo (R)	<u>Zeocin Resistenzgen</u>

# 1 Einleitung

## 1.1 Tumorgenese

Im Normalgewebe reguliert die Balance von Zellteilung, Differenzierung und programmiertem Zelltod (Apoptose) die Gewebekomöostase (Wagener, 1999). Wenn diese aus dem Gleichgewicht gerät, kann sich Tumorgewebe entwickeln. Die Tumorentstehung und -progression bis zur Metastasenbildung wird durch erworbene und/oder vererbte Aberrationen bedingt (*Abb 1*). Diese Veränderungen betreffen Gene, die man vereinfachend in zwei Klassen unterteilen kann: Onkogene und Tumorsuppressorgene, TSG. Diese Aberrationen sind von besonderer Bedeutung in speziellen Tumorstammzellen, denen neuerdings eine entscheidende Rolle für die Tumorprogression bis hin zur Metastasierung zugeschrieben wird (Wicha et al., 2006).



**Abb 1: Entwicklung eines Normalgewebes zum Primärtumor bis zur Metastase.** „Stepwise malignant progression of human cancer in association with accumulation of genetic alterations in cells.“ Schematische Darstellung aus (Yokota, 2000).

### 1.1.1 Genetische Alterationen bei der Tumorgenese

Die Produkte von sowohl Onkogenen als auch TSG spielen normalerweise eine Rolle bei der Proliferation, Differenzierung und Apoptose (Alberts et al., 2002; Yokota, 2000). Die Produkte der Onkogene verhalten sich proliferationsfördernd. Hier reicht die Mutation eines Allels aus, um einen onkogenen Effekt zu erzielen. Die Produkte der TSG verhalten sich dagegen eher proliferationshemmend. Die TSG sind in der Regel rezessiv, d.h. beide Allele müssen mutiert sein.

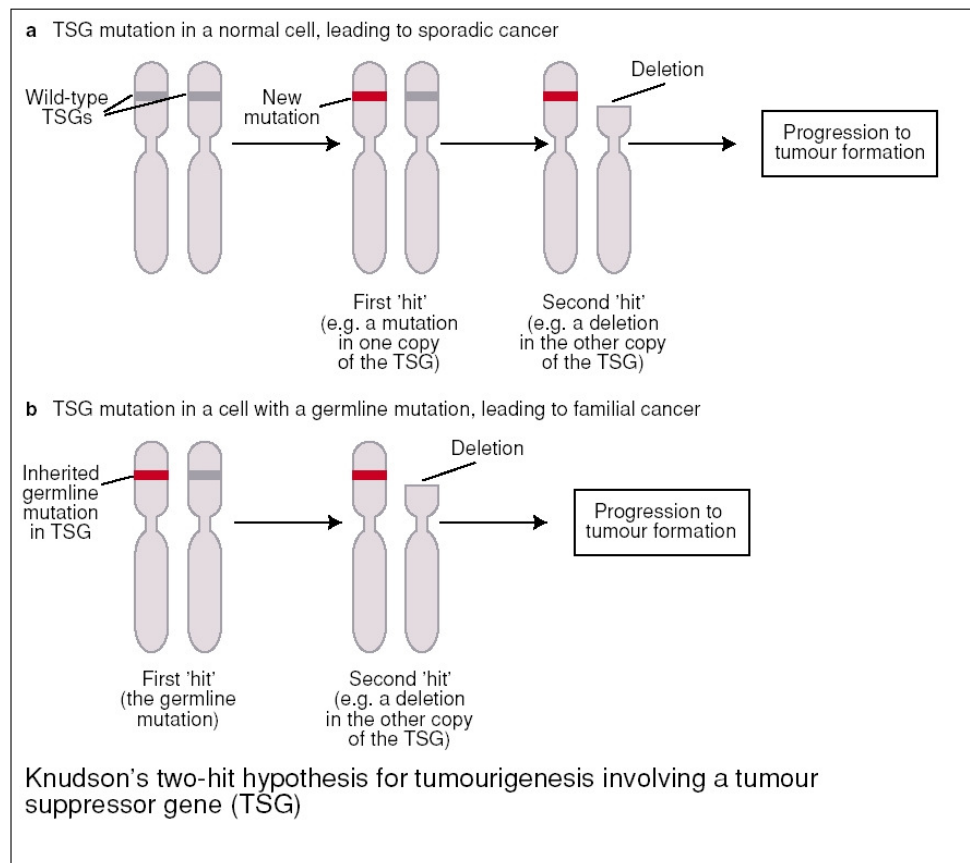
Durch Mutationen, Amplifikation oder Rearrangement kann ein Proto-Onkogen zu einem Onkogen werden (Todd and Wong, 1999). Als Beispiel dafür sei die Genfamilie RAS genannt (Bos, 1989). Das sind GTPasen, die durch die alternierende Bindung der Nukleotide GDP oder GTP als molekulare „Schalter“ in



Signaltransduktionsketten fungieren. Das Proto-Onkogen HRAS, um ein Beispiel der RAS-Familie zu nennen, wird in verschiedenen Tumoren durch Punktmutationen aktiviert, die gehäuft in Codon 12 lokalisiert sind. Durch diese Mutationen wird HRAS zu einem Onkogen transformiert, das als konstitutiv aktives Signalmolekül zu einer deregulierten Signalübertragungskaskade in Tumoren führt. Ein Beispiel für die Tumorentstehung durch Amplifikation und/oder Überexpression eines Onkogens ist HER-2/neu in ovarialen Tumoren und Mammakarzinomen. Die Amplifikation von HER-2/neu korrelierte mit schlechter Prognose (Slamon et al., 1989). Eine Punktmutation des Her-2/neu-Gens führt zu einer Zellzyklus-unabhängigen Kinaseaktivität und stimuliert dadurch die Proliferation (Kiyokawa et al., 1995).

In humanen Tumorzellen werden die TSG in der Regel durch genetische und/oder epigenetische Veränderungen inaktiviert (Braga et al., 2003; Knudson, 1971). Den Ablauf einer solchen Inaktivierung beschreibt die klassische „two-hit“ Hypothese, die für das Retinoblastom, einen kindlichen Augentumor, anhand des RB1-Gens entwickelt wurde (*Abb 2*) (Knudson, 1971; Richards, 2001). Das RB1-Gen ist eines der ersten und am besten untersuchten TSG. Ein Retinoblastom ist die Folge des Funktionsverlustes beider Kopien des Retinoblastomgens. Im Falle der erblichen Disposition handelt es sich um eine Keimbahnmutation im RB1-Gen, ansonsten sind beide Mutationen somatisch (Lohmann et al., 1997). Beide Allele eines TSG müssen in der Regel inaktiviert sein, damit eine maligne Läsion entsteht. Die Inaktivierung kann durch Mutationen wie beim RB1-Gen erfolgen oder durch Allelverluste und Deletionen. Letztere können durch Analysen des Verlustes der Heterozygotie detektiert werden (loss of heterozygosity, LOH) (Cavenee et al., 1983; Imreh et al., 2003).

Chromosomenabschnitte, welche ein TSG enthalten, können auch durch die Komparative Genomhybridisierung (CGH) detektiert werden (Imreh et al., 2003). Des weiteren konnten auch Fusionshybride aus Tumorzellen und nichttumorösen Zellen Hinweise auf TSG-Aktivität geben, wobei diese Hybridomazellen eine supprimierte Tumorigenität in immundefizienten Mäusen aufwiesen. Dies kann als Hinweis darauf gedeutet werden, dass tumorsupprimierende Eigenschaften auf das synthetische Gesamtsystem übertragen wurden. Schon einzelne Chromosome beziehungsweise Chromosomenabschnitte vermochten die Tumorigenität von Hybridomazellen herunterzuregulieren (Kholodnyuk et al., 2006). Das Auftreten von Revertanten solcher Hybridomazellen wurde dann wieder dem Einfluss von Mutationen einzelner TSG zugeschrieben.



**Abb 2: „Two-hit“-Hypothese.** Transformation einer Zelle durch Inaktivierung eines TSG. Normale Individuen haben zwei normale Kopien von TSG, so dass zwei „hits“, Mutationen, nötig sind, um eine Tumorerkrankung zu initiieren [a]. Individuen mit einer Keimbahnmutation eines TSG haben bereits den ersten „hit“ und benötigen zur Tumorentwicklung nur noch eine zweite Veränderung [b]. Nach Knudson aus (Richards, 2001).

Die Einteilung in Onkogene und TSG ist nicht streng dogmatisch zu sehen. Genprodukte wie z.B. von JUNB können je nach Zustand der Zelle sowohl tumorsuppressive als auch onkogene Wirkung zeigen (Farras et al., 2008).

Bisher beschriebene Onkogene und TSG sind in der Regel proteinkodierende Gene. Auch microRNA (kleine, nicht protein-kodierende RNA) kann durch Mutationen, Deletionen, Amplifikationen und/oder veränderte Expressionen sowohl onkogenes Potenzial als auch tumorsupprimierende Eigenschaften aufweisen (Esquela-Kerscher and Slack, 2006; Negrini et al., 2007). Häufig kodieren sogenannte fragile Regionen des Genoms, wie z.B. FRA3B (Braga et al., 2003; Huebner, 2001; Kholodnyuk et al., 2006), nicht nur für TSG, sondern auch für microRNAs. Als eine instabile Chromosomenregion gilt auch der Abschnitt 3p21.1-21.2, der oft in Bronchial- und Mammakarzinomen deletiert ist und in deren Nähe FAM107A kartiert wird. Dieses Areal kodiert auch für zwei microRNAs, let-7g und 135a-1 (Calin et al., 2004). Die ektopische Expression von let-7g supprimiert das Wachstum von murinen und humanen großzelligen Bronchialkarzinomen (Kumar et al., 2008).

### **1.1.2 Epigenetische Alterationen bei der Tumorgenese**

Wird die Funktionalität genetischen Materials ohne Modifikation der Basensequenz verändert, spricht man von epigenetischer Regulation beziehungsweise Modulation (Dammann, 2004). Einerseits kann die DNA im Promotorbereich an den Cytosin-Basen methyliert werden. Andererseits können die Histonproteine durch Azetylierung, Methylierung, Ubiquitinylierung und Phosphorylierung modifiziert werden. Sowohl DNA- als auch Histonproteinmodifikationen können eine Bindung von Transkriptionsfaktoren an spezifischen Erkennungssequenzen und somit die Genexpression beeinflussen (Feinberg and Tycko, 2004; Nan et al., 1998). Die Analyse von CpG-reichen Sequenzen am 5'-Ende von Genen, sogenannte CpG-Inseln (Bird, 1986), gibt ersten Aufschluss darüber, ob eine Inaktivierung des Gens zu erwarten ist. CpG-Inseln sind im Normalgewebe nicht methyliert, während sie im Tumorgewebe vorzugsweise im Promotorbereich von Genen methyliert werden können (Dammann, 2004). Dies kann zur Abschaltung der entsprechenden Gene führen und zur Tumorentstehung oder -progression beitragen (Esteller, 2005; Szyf, 2005). In Tumorgewebe und im Modell von Tumorzelllinien kann die Transkription nach Methylierung durch eine Behandlung mit Decitabin, einem DNA-Methyltransferase-Inhibitor, wiederhergestellt werden. Ein Beispiel für die Inaktivierung der Genexpression durch Methylierung eines TSG ist die Herunterregulation des Transkriptes des Gens FHIT. Im Intron zwischen dem 1. und 2. Exon von FHIT befindet sich eine CpG-Insel, die in 54% der untersuchten Fälle in klarzelligen Nierenkarzinomen methyliert ist (Kvasha et al., 2008).

Eine Chromatinmodifikation durch Modulation der Histone bewirkt, dass die Genexpression sterisch behindert oder auch gefördert werden kann (Rodenhiser and Mann, 2006; Seo et al., 2008). Dabei werden die Amino-Enden der Histonproteine chemisch modifiziert. Die Histonazetylierung ist mit transkriptioneller Aktivität assoziiert, da sie zu einer „Auflockerung“ der Chromatinstruktur führt. Die Histondeazetylierung korreliert dagegen mit transkriptioneller Repression. Behandlungen von Zellen mit Inhibitoren wie Histondeazetylasehemmern, z.B. Trichostatin (TSA) beeinflussen die Chromatinstruktur, so dass eine Genexpression wieder möglich wird. Ein Beispiel hierfür ist das putative TSG DLEC1, dessen Expression nach TSA-Behandlung in ovariellen Tumorzelllinien hochreguliert wurde (Kwong et al., 2006).

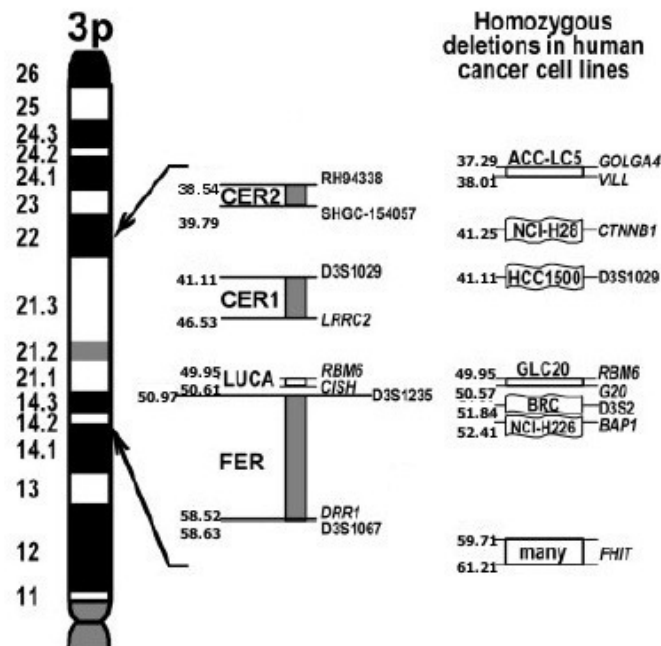
## 1.2 Das humane FAM107A

Im Zuge der Suche nach TSG auf dem Chromosomenabschnitt 3p wurde das Gen FAM107A (family with sequence similarity 107, member A, DRR1, TU3A) gefunden. Je nach Beschreiber wurde das Gen entweder DRR1, downregulated in renal cell carcinoma (Wang et al., 2000), oder TU3A, Tohoku University cDNA clone A on chromosome 3 (Yamato et al., 1999) genannt. Die Bezeichnung DRR1 ist nicht zu verwechseln mit dem namensgleichen Gen Drr1, developmentally regulated repeat element-containing transcript 1, das ein anderes Gen einer anderen Spezies, nämlich der Maus (*Mus musculus*) darstellt beziehungsweise DRR1, TOR1, ein Gen der Spezies *Saccharomyces cerevisiae*. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird die offizielle Bezeichnung FAM107A nach HUGO Gene Nomenclature Committee, HGNC: 30827 (Wain et al., 2002) angewandt, auch wenn in einzelnen Veröffentlichungen andere Bezeichnungen verwendet werden (*Tab 8.1*, S.145f.).

Der kurze Arm des Chromosoms 3 (3p) ist oft in menschlichen Tumoren deletiert. Homozygote Deletionen wurden besonders in 3p12-p14 und in 3p21.3 beschrieben (Imreh et al., 2003; Kholodnyuk et al., 2006; Kok et al., 1997; Zabarovsky et al., 2002). Dies lässt die Anwesenheit von TSG in diesen Regionen vermuten. Einige Gene mit Tumorsuppressoreigenschaften wurden bereits beschrieben, so z.B. VHL (Braga et al., 2003; Zabarovsky et al., 2002) oder RASSF1 (Braga et al., 2003; Huebner, 2001; Kholodnyuk et al., 2006; Kok et al., 1997; Zabarovsky et al., 2002). Molekulare und zytogenetische Analysen legen die Existenz weiterer TSG in den Regionen 3p12-13 und 3p14-21 nahe (Zabarovsky et al., 2002). Speziell eine 630kb große Region in 3p21.3 (lung cancer tumor suppressor gene region, LUCA-TSG-Region) wurde definiert durch überlappende, homozygote Deletionen in Bronchial- und Mammakarzinomen (Kholodnyuk et al., 2006; Lerman and Minna, 2000). Die Abbildung 3 zeigt auch die Lokalisation von FAM107A, hier noch bezeichnet als DRR1, und macht deutlich, dass die spezielle Region um FAM107A in den untersuchten Zelllinien nicht homozygot deletiert ist.

Die Identifikation von FAM107A gelang bei der Analyse der Region um den Marker D3S1067, der in der Mehrzahl klarzelliger Nierenzellkarzinome mit 56% von allen getesteten Proben die häufigsten Allelverluste (LOH) aufwies (Orikasa et al., 1998; Wang et al., 2000; Yamato T, 1999). In den inzwischen bekannten Sequenzen des menschlichen Genoms kartiert FAM107A 94kB distal von D3S1067 (Braga et al., 2003; Huebner, 2001; Kent et al., 2002; Wang et al., 2000). Je nach Beschreiber

gehört dieser Chromosomenabschnitt zu 3p21.1 (Maglott et al., 2005; Wang et al., 2000) beziehungsweise 3p14.2 (Kent et al., 2002).

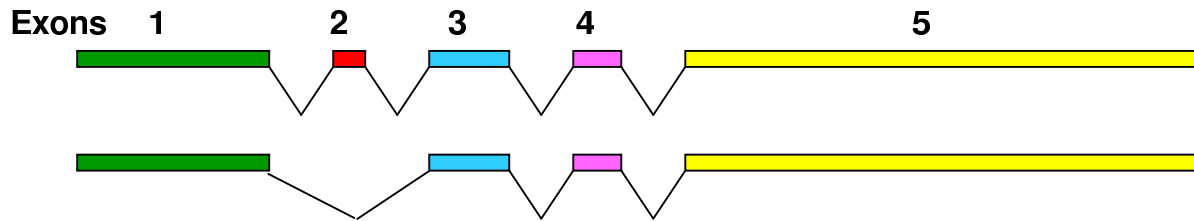


**Abb 3: LUCA-TSG-Region.** Lokalisierung von CER1: common eliminated region 1, CER2: common eliminated region 2, FER: frequently eliminated region, definiert durch Überlappungen von verschiedenen homozygoten Deletionen in 3p22-p14 in menschlichen Karzinomzelllinien. Diese sind gekennzeichnet durch die Angaben in den Flaggensymbolen (Daigo et al., 1999; Huebner et al., 1998; Lerman and Minna, 2000). Die Positionen der Marker in Mb-Distanzen auf dem Chromosom 3p sind aktualisiert worden entsprechend dem Human Genome Browser von UCSC, in der Veröffentlichung vom März, 2006 (Kent et al., 2002). Nach Kholodnyuk et al., 2006.

### 1.2.1 Struktur des FAM107A-Gens und seiner Haupttranskripte

Die genaue chromosomale Lokalisation der Referenzsequenz-mRNA, angegeben in Basenpaaren, ist der Bereich der Basenpaare 58.538.531 bis 58.524.884bp (Maglott et al., 2005) auf dem Minus-Strang von 3p. Die Datenbank NCBI (Wheeler et al., 2000) führt zwei Referenzsequenzen an, NM\_007177, FAM107A Transkriptvariante 1-mRNA und NM\_001076778, Transkriptvariante 2-mRNA (Abb 4). Der potenzielle offene Leserahmen (open reading frame, ORF) umfasst 435bp (Basenpaar 560-994, NM\_007177) (Wang et al., 2000).

In Nierenzellkarzinomzelllinien wurden unterschiedliche Punktmutationen detektiert, die auch zu einem Aminosäureaustausch führten: in Codon 19 eine Basensubstitution in vier von zwölf untersuchten Zelllinien, eine in Codon 15 (Wang et al., 2000). Daneben kamen in den untersuchten Zelllinien Polymorphismen in Codon 89 und 104 vor. In 34 untersuchten primären renalen Zellkarzinomen wurden diese Punktmutationen nicht detektiert.



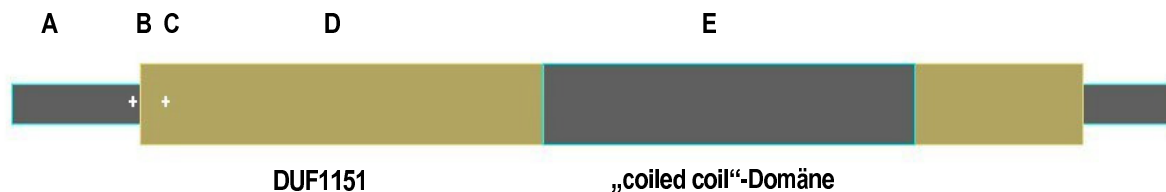
**Abb 4: FAM107A-Gen: Transkriptvarianten 1 (oben) und 2 (unten).** Darstellung der Exon-Intronstruktur. Transkriptvariante 1 umfasst 3.465bp mit 5 Exons, Transkriptvariante 2 3.367bp mit 4 Exons. Der Unterschied besteht darin, dass Exon 2 (Basenpaar 457 bis 554, Transkriptvariante 1) nicht in der Variante 2 enthalten ist. Das Gen mit Introns umfasst 13.648bp, gemessen vom Transkriptionsstart, Exon 1, bis einschließlich Exon 5 (genomische Referenzsequenz NC\_000003, Chromosom 3, reference assembly, complete sequence, 199501827bp, 30-AUG-2006 (Wheeler et al., 2000). Grün: Exon 1 (456bp); rot: Exon 2 (98bp); blau: Exon 3 (175bp); lila: Exon 4 (157bp); gelb: Exon 5 (2.579bp); Introns sind als Lücken zwischen den exonischen Sequenzen angedeutet. Die Abbildung ist nicht maßstabgerecht.

### 1.2.2 Das Proteinprodukt des FAM107A-Gens

Die *In-vitro*-Translation der kompletten Sequenz der mRNA von FAM107A (Volllänge) führt zu einem Genprodukt von 144 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 18kDa (Wang et al., 2000). Das rekombinante Protein, bezeichnet als rDRR1, war nach *In-vitro*-Translation der FAM107A-ORF-mRNA ein lösliches Protein mit einem Molekulargewicht von ~18,7kDa. Da die Löslichkeit des letztgenannten rekombinanten Proteins temperaturabhängig war, waren ~80% bei 37°C löslich, dagegen nahezu 100% bei 20°C (Zhao et al., 2008). Dies ist für *In-vitro*-Analysen wie z.B. für die Extraktion des Proteins von Bedeutung.

Das Protein enthält eine putative „coiled coil“-Domäne (aa66-112, O95990) (Wheeler et al., 2000) und zwei Bereiche geringer Komplexität („low complexity“, aa81-90 und aa97-100). Bei Proteinen mit „coiled coil“-Domänen handelt es sich um eine besondere Sekundärstruktur der Proteine, bei der sich mehrere Helices eines oder mehrerer Proteine aneinanderlagern können, was von zentraler Bedeutung für Protein-Protein-Wechselwirkung sein kann (Lupas, 1996). Beschrieben werden zwei mögliche Isoformen 1 und 2, wobei das Vorkommen von Isoform 2, die noch ein Intron enthält, nicht experimentell belegt ist (Wheeler et al., 2000). Des weiteren weist das Genprodukt von FAM107A eine Domäne mit unbekannter Funktion auf, „Domain of unknown function 1151“ (DUF1151; Conserved Domains Database, CDD: 70111) (Marchler-Bauer et al., 2007). Diese ist bei einer Vielzahl von hypothetischen eukaryotischen Proteinen mit unbekannter Funktion zu finden (Pfam. 06625) (Finn et al., 2006). Zu diesen gehört ebenfalls FAM107B als zweites Gen der

Familie „family with sequence similarity 107“ (validierte Referenzsequenz NM\_031453, 3.785bp, 5 Exons). Diese Proteindomäne DUF1151 findet sich in 26 unterschiedlichen Spezies von Coelomata, unter anderem beim Schimpansen (*Pan troglodytes*), der Maus (*Mus musculus*) oder der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) (*Abb 55*) (Marchler-Bauer et al., 2007; Zhao et al., 2007). Somit ist diese Homologie zum humanen FAM107A innerhalb der Coelomata hochkonserviert, was auf eine wichtige Funktion dieser Proteinstruktur hinweist.



**Abb 5: FAM107A-Genprodukt.** Schematische Darstellung folgender Regionen (Angaben in aa):

- A** Gesamtlänge des Proteins FAM107A: 144aa
- B** aa15. Variante: L -> M (in Ovarial- und Nierenzellkarzinomzelllinien) (Wang et al., 2000)
- C** aa19: Variante: P -> L (detektiert in einer Nierenzellkarzinomzelllinie) (Wang et al., 2000)
- D** Region 16-133aa: Domäne DUF1151 (O95990) (Wheeler et al., 2000)
- E** Region: 66-112aa: putative „coiled coil“-Domäne, experimentell nicht belegt (O95990) (Wheeler et al., 2000)

Das Genprodukt von FAM107A ist ein mutmaßlich sowohl nukleär (Wang et al., 2000; Zhao et al., 2007) als auch im Zytoskelett (Petrecca et al., 2003; Simpson et al., 2000) lokalisiertes Protein (Locus: O95990) (Wheeler et al., 2000), dem eine antiproliferative Aktivität zugeschrieben wird (Wang et al., 2000; Zhao et al., 2007). Ob es sich somit hierbei um ein Strukturprotein handelt, ist noch unklar.

### 1.2.3 Mögliche Funktionen von FAM107A (Stand der Forschung)

In Normalgewebe wird das FAM107A-Transkript in vielen Geweben exprimiert. Eine mögliche Bedeutung von FAM107A besonders für neuronale Strukturen zeigte eine Meta-Analyse von cDNA-Microarraydaten auf (Chong et al., 2007). Danach wurde FAM107A zusammen mit den Ampa-Rezeptoren, Neurotransmitter-Rezeptoren im Gehirn (GRIA1, GRIA2, GRIA3, GRIA4), exprimiert. Zusätzlich fanden sich bei dem Gen FAM107A vergleichbare Promotorstrukturen, weshalb man annehmen kann, dass die AMPA-Rezeptoren und FAM107A ähnlich reguliert werden.

Auch für die Entwicklung neuronaler Strukturen könnte FAM107A von Bedeutung sein. So fand sich die homologe *Xenopus*-FAM107A-mRNA hauptsächlich entlang von Ektoderm und Mesoderm in Whole-mount-in-situ-Hybridisierungen (Zhao et al.,

2007), in der späteren Embryogenese im Hirn, Herz und Somiten. In allen Stadien der frühen embryonalen Entwicklung wurde die FAM107-mRNA exprimiert, wobei die Expression mit der embryonalen Entwicklung zunahm und in allen untersuchten Geweben detektiert wurde. Eine vergleichsweise hohe Expression fand sich im Hirn (ohne genauere Spezifizierung) und im Herzen. Humane embryonale Stammzellen (human embryonic stem cells, ESC), die sich nach acht bis zehn Tagen zu primitivem Neuroektoderm differenzierten und weiter zu definitivem Neuroepithel, wurden mittels cDNA-Microarrays analysiert (Pankratz et al., 2007). Die Genexpression zwischen der Entwicklung nach 10 und nach 17 Tagen unterschied sich im allgemeinen kaum. FAM107A-mRNA dagegen wurde zusammen mit den Transkripten von weiteren neun Genen hochreguliert, unter anderem mit TSG wie ST18 und GADD45G. Diese Daten unterstreichen eine mögliche Rolle von FAM107A bei der embryonalen Genese.

Es existieren Hinweise darauf, dass FAM107A als TSG fungieren könnte. So konnte nach transienter Transfektion von FAM107A-cDNA in die Nierenkarzinomzelllinien HTB-44 und HTB-46 eine retardierte Proliferation transfizierter Zellen im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden (Wang et al., 2000). Dieser Effekt wurde auch bei der Lungenkarzinomzelllinie A549 beobachtet (Zhao et al., 2007), wobei diese mit einem Vektor transient transfiziert wurde, der das FAM107A-Homologe des Afrikanischen Krallenfroschs (*Xenopus laevis*) enthielt. Desweiteren zeigten Studien eine Herunterregulation von FAM107A-mRNA in soliden Tumoren (Ancona et al., 2006; Evans et al., 2001; Fathallah-Shaykh et al., 2003; Febbo and Sellers, 2003; Wissmann, 2002). Bei Gliomen wurde mit der suppressiven Subtraktionshybridisierung (SSH) in drei von vier Tumorpaaren (Primärtumor, Gliom WHO Grad II versus Rezidivglioblastom, Gliom WHO Grad IV) eine Herunterregulation von FAM107A auf transkriptioneller Ebene gefunden (van den Boom, 2004), was in denselben Proben und in fünf weiteren von sieben Probenpaaren durch Real-Time-RT-PCR (quantitative RT-PCR, qRT-PCR) bestätigt wurde. Diese signifikant niedrigere Expression von FAM107A-mRNA in primären Glioblastomen gegenüber diffusen Astrozytomen wurde mit der malignen Progression von Gliomen assoziiert (van den Boom et al., 2006). Unterstützt werden die Expressionsdaten von Ergebnissen genomischer Analysen. So zeigte eine CGH-Analyse mit cDNA-Microarrays von insgesamt 14 nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (6 Plattenepithelkarzinome, SQCA; 8 Adenokarzinome, ADCA) eine Reduktion der Kopienzahl von FAM107A in 11 von 14 Fällen (79%) (Jiang et al.,



2004). Des weiteren wurden in einem Mausmodell in A9-Mausfibrosarkomzellen das humane Chromosom 3 per Zellfusion eingebracht und Hybride anschließend in SCID-Mäuse injiziert (Kholodnyuk et al., 2006). Gewachsene Tumore wurden den Mäusen entnommen, *in vitro* kultiviert und analysiert. Mittels RT-PCR wurde die Expression von solchen 3p-Genen analysiert, die in bekannte Regionen chromosomaler Instabilität bei Malignomen kartieren. Die Expression von FAM107A-mRNA war neben der anderer Gene in zwei von neun „chr3+“ Tumoren herunterreguliert und in sieben weiteren verloren gegangen. Bei Kolonkarzinompatienten korrelierte hochreguliertes FAM107A mit einer vergleichsweise guten Überlebensprognose (Eschrich et al., 2005).

Zu den Ergebnissen, die für eine Funktion von FAM107A als TSG sprechen, gibt es auch widersprüchliche Beobachtungen. In follikulären Schilddrüsenkarzinomen fand sich gegenüber follikulären Schilddrüsenadenomen eine Hochregulation (Barden et al., 2003). Des weiteren fand sich eine Hochregulation bei BRCA1-positiven, hereditären Mammakarzinomen (Dudaladava et al., 2006). BRCA1-positive Mammakarzinome zeichnen sich durch eine frühe Manifestation, eine hohe Tumorigenität und verstärkte Lymphozyteninfiltration aus. Beim Wilms Tumor korrelierte die Hochregulation von FAM107A-mRNA auch mit schlechterer Prognose (Takahashi et al., 2002). Des weiteren gibt es Untersuchungsergebnisse, die FAM107A als ein Gen identifizierten, das bei Gliomen mit augmentierter Invasion einhergeht (Petrecca et al., 2004; Petrecca et al., 2003; Waldkircher de Oliveira et al., 2005). Dabei schien MAP1A ein FAM107A-assoziiertes Genprodukt zu sein und die Invasion zu fördern. Die letztgenannten Ergebnisse wurden bisher nur als Abstracts veröffentlicht.

Ein weiterer Aspekt ist eine mögliche Regulierbarkeit der transkriptionellen Aktivität von FAM107A. Im Rahmen einer Cortisonbehandlung war die Expression dieses Gens beispielsweise in primären bronchialen Epithelzellen beziehungsweise Linsenzellkulturen hochreguliert (Chari et al., 2005; Gupta et al., 2005; Rozsa et al., 2006).

## **1.3 Methodische Überlegungen**

### **1.3.1 Zellkultursysteme**

In vorliegender Arbeit wurden Expressionsanalysen unter anderem an Gewebeproben durchgeführt. Desweiteren wurden immortalisierte Zellen (Zellkultursysteme) genutzt. In Zellkulturen kann unter Umständen die

Genexpression durch Einflüsse wie Tageszeit, Konfluenz oder Temperatur moduliert werden. Von Nachteil für Analysen in Zellkulturen ist die Tatsache, dass Zellen in Zellkulturen in der Regel als eine heterogene Population vorliegen. Ferner werden auch Kontaminationen in Zelllinien beschrieben (Drexler et al., 2003; O'Brien, 2001). Auch wenn, wie schon in früheren Untersuchungen festgestellt wurde, sich die Ergebnisse von *In-vitro*-Untersuchungen nicht vollständig auf natürliche Gewebezellen übertragen lassen, führen diese Versuche in jedem Fall zu brauchbaren ersten Ergebnissen, die mit *In-vivo*-Modellen wie im Mausmodell überprüft werden können. Zur Charakterisierung von Genen können Vektoren konstruiert und Zelllinien hergestellt werden, die das entsprechende Genprodukt stabil exprimieren (Bonetta, 2005).

### 1.3.2 *In-vitro*-Tumorigenitätsmarker

Diverse Parameter können analysiert werden, die einen malignen Phänotyp von Zellen anzeigen. Erste Aufschlüsse darüber kann eine veränderte Morphologie der Zellen geben. Unterschiede in der Proliferation der Zellen können durch Surrogatmarker wie die Expression von Ki67/Mib1-Antigen detektiert werden. Das Wachstum von Zellen in Weichagarmedium zeigt kontakt-unabhängiges Wachstum an und ist ein Indikator für Tumorigenität (Carney et al., 1980). Als weiterer Tumormarker kann die Expression von Survivin gemessen werden. Survivin gehört zu der IAP-Genfamilie (inhibitor of apoptosis), die für negativ regulatorische Proteine kodieren, die apoptotischen Zelltod verhindern. Oft wird Survivin in Tumorzellen detektiert, seine Expression korreliert mit niedrigen Überlebensraten bei unterschiedlichen Tumorerkrankungen, auch z.B. bei Nierenzellkarzinomen (Kosari et al., 2005; Krambeck et al., 2007; Parker et al., 2006). Die Sezernierung von aktiven Matrixmetalloproteinasen (MMP) wie MMP2 befähigt Zellen, in die umgebende Matrix einzudringen, eine Voraussetzung für Metastasierung (Nagase et al., 1999). So kann die Expression von MMP2 auf potenzielle Metastasierung hinweisen. Desweiteren kann die Sensitivität gegenüber der Behandlung mit DNA-schädigenden Substanzen wie z.B. Cisplatin, einem häufig in der Tumorthapie verwendeten Zytostatikum, überprüft werden. Von einem potenziellen TSG wird erwartet, dass es Tumorzellen gegenüber DNA-schädigenden Substanzen sensibilisiert.

## **1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

FAM107A ist aufgrund seiner Lokalisation in der menschlichen, oft deletierten Chromosomenregion 3p14.3-21.1, der möglichen antiproliferativen Aktivität seines Genproduktes *In-vitro* (Wang et al., 2000) und insbesondere seiner transkriptionellen Herunterregulation in zahlreichen Tumorgeweben ein Kandidat für ein TSG. Um FAM107A als ein Gen mit möglicher TSG-Aktivität zu charakterisieren, sollten folgenden Teilziele erarbeitet werden:

### **Expressionsanalysen**

Da es sich bei den cDNA-Microarray-Analysen, die u.a. eine Herunterregulation von FAM107-mRNA zeigten, um große Datenmengen handelt mit Fokus auf anderen Genen als FAM107A, ist in den wenigsten Fällen die Expression von FAM107A-mRNA durch weitere Methoden wie RT-PCR überprüft worden. Deshalb sollten in der vorliegenden Arbeit diverse Tumorzelllinien und, soweit verfügbar, Tumor- und Normalgewebeproben mit qualitativer RT-PCR auf die Expression von FAM107A untersucht werden.

### **Analyse möglicher epigenetischer Regulation**

Auf einen wesentlichen Mechanismus der Inaktivierung von TSGs, die Methylierung ihrer Promotorregionen, sollte durch Behandlung mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor Decitabin getestet werden. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob auch die Behandlung von Zellen mit einem Deazetylase-Inhibitor wie TSA die Expression von FAM107A-mRNA beeinflussen kann.

### **Charakterisierung FAM107A ektopisch exprimierender Zelllinien**

Zur ektopischen Expression von FAM107A sollten eukaryotische Expressionsvektoren mit unterschiedlichen Konstrukten hergestellt und mit diesem Vektor stabil transfizierte Zelllinien etabliert werden. Diese sollten dahin getestet werden, ob Merkmale eines malignen Phänotyps dieser Zelllinien verändert werden können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Zelllinien

Bei den verwendeten Zelllinien (*Tab 2.1*, S.14f.) handelt es sich ausschließlich um humane Zelllinien. Die Authentizität wurde unter anderem durch mikroskopischen Abgleich mit der elektronisch verfügbaren Dokumentation zur entsprechenden Morphologie überprüft. Die Zelllinien wurden darüberhinaus größtenteils karyotypisiert bis auf jene Zelllinien, von denen nur eingefrorene Zellpellets, Zell-Lysate, RNA oder cDNA (Kapitel 2.1.3 und 4) vorlagen. Die Karyotypisierung (Kapitel 2.4.1) erfolgte aus Gründen der Qualitätssicherung und diente speziell der Analyse der Chromosomenregion 3p.

Die Zelllinien HeLa, MCF7 und HTB-46 wurden zusätzlich mittels DNA-Fingerprinting analysiert (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, MOLEKULARBIOLOGIE, DSMZ). Nach Isolation der DNA wurde mit Hilfe einer Nonaplex-PCR ein DNA-Profil von 8 hochpolymorphen Loci von Mikrosatelliten („Short Tandem Repeat“, STR) erstellt (Dirks et al., 2005), die der Charakterisierung der Zelllinien dienten. Bei dieser werden neben der Geschlechtsanalyse folgende Loci analysiert: D5S818 (D5), D13S317 (D13), D7S820 (D7), D16S539 (D16), vWA, THO1, TPOX, CSF1PO. Die Amplifikationsprodukte der Multiplex-PCR-Reaktion, einer mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Primern durchgeführten PCR, wurden kapillarelektrophoretisch aufgetrennt. Anhand ihrer Größe (jeweils ein Vielfaches eines Tetranukleotids) wurden die verschiedenen Allele unterschieden, die mit Zahlen von 3 bis 23 bezeichnet wurden (*Tab 3.2*, S.57). Die Ergebnisse wurden mit den Profilen von unterschiedlichen Datenbanken abgeglichen.

Die verwendeten Passagenangaben wurden in den entsprechenden Laborbüchern vermerkt. In einigen Untersuchungen standen mit Viren (*Tab 8.6*, S.150) behandelte Zellen zur Verfügung. Soweit verfügbar, wird die Anzahl der Viruspartikel im Verhältnis zu der der Zellen als Multiplicity of Infection, „MOI“ angegeben. Die verwendeten Zellen wurden mit dem ICD-O-3-Code (WHO, 2000) charakterisiert. Der ICD-O-3-Code ist ein duales Klassifikations- und Kodiersystem, das von der WHO entwickelt worden ist, um onkologische Läsionen topografisch und morphologisch genau zu beschreiben. Für eine systematische Auswertung der

Untersuchungsergebnisse wurden in jenen Fällen, in denen Zellen oder Gewebeteile von benignen, semimaligen oder malignen Neoplasien einer Analyse zugeführt wurden, die korrespondierenden geometrischen Eigenschaften nach dem zytomorphologischen beziehungsweise histomorphologischen Segment der Kodierung nach dem ICD-O-3-System aufgeführt. Der topografische Anteil der Kodierung wurde hingegen auch für Lokalisationsangaben zu den Proben aus augenscheinlich normalem oder entzündlich veränderten Gewebe angegeben.

**Tab 2.1: Übersicht über die verwendeten Zelllinien (alphabetisch sortiert).**

#### 1 ACHN

<b>Zelltyp:</b>	Zellen klarzelligen Nierenzellkarzinoms (ICD-O-3 Code: 8312/6).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Niere (C64.9).
<b>Entnahmelokalisierung:</b>	Metastase. Pleuraflüssigkeit (C38.4).
<b>Patient:</b>	♂, 22 Jahre alt, „Caucasian“.
<b>Bemerkungen:</b>	Adhärent wachsende Zelllinie, tumorigen in Nacktmäusen (Tax-ID: 10090).
<b>Literaturstelle:</b>	(Kochevar, 1990).
<b>Bezugsquelle:</b>	Prof. Dr. Gerd Ryffel, Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen.

#### 2 ARPE-19

<b>Zelltyp:</b>	Pigmentepithelzellen (ICD-O-3 Code: Entfällt).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Retina (C69.2).
<b>Entnahmelokalisierung:</b>	Retina (C69.2).
<b>Patient:</b>	♂, 19 Jahre alt, keine Angaben zur ethnischen Zugehörigkeit.
<b>Bemerkungen:</b>	Adhärent wachsende Zelllinie. Patient war Unfallopfer.
<b>Literaturstelle:</b>	(Dunn et al., 1996).
<b>Bezugsquelle:</b>	PD Dr. Helmut Deißler, AG Molekulare Onkologie, Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Ulm.

#### 3 BLM

<b>Zelltyp:</b>	Maligne Melanomzellen (ICD-O-3 Code: 8721/6).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Haut (C44.9).
<b>Entnahmelokalisierung:</b>	Metastase. Pulmo (C34.9).
<b>Patient:</b>	♂, 34 Jahre alt, „Caucasian“.
<b>Bemerkungen:</b>	Hoch metastatische Zelllinie. Die Zellen wuchsen nach subkutaner Inokulation von BRO-Zellen in Nacktmäusen (Tax-ID: 10090).
<b>Literaturstelle:</b>	(van Muijen et al., 1991a; van Muijen et al., 1991b).
<b>Bezugsquelle:</b>	Dr. Guido Swart, Department of Biomolecular Chemistry, Faculty of Science, Radboud University Nijmegen.

#### 4 DH1

<b>Zelltyp:</b>	Stromazellen (ICD-O-3 Code: Entfällt).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Pulmo (C34.9).
<b>Entnahmelokalisierung:</b>	Metastase. Pulmo (C34.9).
<b>Patient:</b>	♂, 58 Jahre alt, „Caucasian“.
<b>Bemerkungen:</b>	Die Zelllinie entstammt der mesenchymalen Reaktion auf eine Metastase eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms (ICD-O-3 Code: 8312/6).
<b>Literaturstelle:</b>	Entfällt.
<b>Bezugsquelle:</b>	PD Dr. Rüdiger V. Sorg, Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ), Universitätsklinikum Düsseldorf.

**5 Drüsenepithelzellen**

<b>Zelltyp:</b>	Drüsenepithel (ICD-O-3 Code: Entfällt).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Pulmo (C34.9).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Pulmo (C34.9).
<b>Patient:</b>	Keine Angaben zu Geschlecht, Alter oder ethnischer Zugehörigkeit (Material war aus Datenschutzgründen anonymisiert).
<b>Bemerkungen:</b>	Primärkultur. Adhärent wachsende Zellen.
<b>Literaturstelle:</b>	(Ebson et al., 2002).
<b>Bezugsquelle:</b>	PD Dr. Dirk Theegarten, Institut für Pathologie, Ruhr-Universität Bochum.

**6 Fibroblasten**

<b>Zelltyp:</b>	Stromazellen (ICD-O-3 Code: Entfällt).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Präputium (C60.0).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Präputium (C60.0).
<b>Patient:</b>	♂, keine Angaben zu Alter und zur ethnischen Zugehörigkeit.
<b>Bemerkungen:</b>	Primärkultur. Adhärent wachsende Zelllinie.
<b>Literaturstelle:</b>	(Kirch et al., 2002).
<b>Bezugsquelle:</b>	Prof. Dr. Opalka, Innere Klinik (Tumorforschung), Universitätsklinikum Essen.

**7 H23**

<b>Zelltyp:</b>	Adenokarzinomzellen (ICD-O-3 Code: 8140/3).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Pulmo (C34.9).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Primärtumor. Pulmo (C34.9).
<b>Patient:</b>	♂, 51 Jahre alt, „African American“.
<b>Bemerkungen:</b>	Adhärent wachsende Zelllinie aus einem primären Bronchialkarzinom.
<b>Literaturstelle:</b>	(Little et al., 1983).
<b>Bezugsquelle:</b>	Prof. Dr. Opalka, Innere Klinik (Tumorforschung), Universitätsklinikum Essen.

**8 H460**

<b>Zelltyp:</b>	Zellen eines großzelligen Bronchialkarzinoms (ICD-O-6 Code: 8012/6).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Pulmo (C34.9).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Metastase. Pleuraflüssigkeit (C38.4).
<b>Patient:</b>	♂, keine Angaben zu Alter und zur ethnischen Zugehörigkeit.
<b>Bemerkungen:</b>	Adhärent wachsende Zelllinie. Sie bildet Tumore nach subkutaner Injektion in Nacktmäusen (Tax-ID: 10090).
<b>Literaturstelle:</b>	(Banks-Schlegel et al., 1985; Takahashi et al., 1989)
<b>Bezugsquelle:</b>	Prof. Dr. Opalka, Innere Klinik (Tumorforschung), Universitätsklinikum Essen.

**9 HBL-100**

<b>Zelltyp:</b>	Nicht näher definierte Epithelzellen (ICD-O-3 Code: Entfällt).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Mamma (C50.9).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Mamma lactans (C50.9).
<b>Patient:</b>	♀, 27 Jahre alt, „Caucasian“.
<b>Bemerkungen:</b>	Adhärent wachsende Zelllinie, die in Softagar Kolonien bildet. Die Zelllinie ist aus zellulären Muttermilchbestandteilen abgeleitet und unterhalb einer Passagezahl von 35 in Nacktmäusen (Tax-ID: 10090) nicht tumorigen. Für Passage >35 ist eine inkrementierte Tumorigenität beschrieben. Die Zellen enthalten integriertes SV40 T Genom (tandemly repeated) und ein Typ D Retrovirus (ähnlich oder identisch mit MPMV).
<b>Literaturstelle:</b>	(Caron de Fromentel et al., 1985; Gaffney et al., 1979).
<b>Bezugsquelle:</b>	PD Dr. Helmut Deißler, AG Molekulare Onkologie, Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Ulm.

**10 HEK-293**

<b>Zelltyp:</b>	Nicht näher definierte epitheliale embryonale Nierenzellen (ICD-O-3 Code: Entfällt).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Niere (C64.9).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Niere (C64.9).
<b>Patient:</b>	Keine Angaben zu Geschlecht, Gestationsalter oder ethnischer Zugehörigkeit des Fetus.
<b>Bemerkungen:</b>	Adhärent wachsende Zelllinie. Sie ist mit HAdV-5 transformiert. Die Zellen sind tumorigen in Nacktmäusen (Tax-ID: 10090).
<b>Literaturstelle:</b>	(Graham et al., 1977).
<b>Bezugsquelle:</b>	Prof. Dr. Opalka, Innere Klinik (Tumorforschung), Universitätsklinikum Essen.

**11 HeLa**

<b>Zelltyp:</b>	Adenokarzinomzellen (ICD-O-3 Code: 8140/3).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Cervix uteri (C53.9).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Primärtumor. Cervix uteri (C53.9).
<b>Patient:</b>	♀, 31 Jahre alt, „African American“.
<b>Bemerkungen:</b>	Adhärent wachsende Zelllinie. HeLa Zellen enthalten HPV18.
<b>Literaturstelle:</b>	(Scherer et al., 1953; Schneider-Gadicke and Schwarz, 1986; Vázquez-Vega et al., 2007).
<b>Bezugsquelle:</b>	Prof. Dr. Opalka, Innere Klinik (Tumorforschung), Universitätsklinikum Essen.

**12 HTB-45**

<b>Zelltyp:</b>	Zellen eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms (ICD-O-3 Code: 8312/3).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Niere (C64.9).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Primärtumor. Niere (C64.9).
<b>Patient:</b>	♂, 78 Jahre alt, „Caucasian“.
<b>Bemerkungen:</b>	Adhärent wachsende Zelllinie, die in halbfestem Medium Kolonien bildet. Die Zellen sind nicht tumorigen in Nacktmäusen (Tax-ID: 10090).
<b>Literaturstelle:</b>	(Fogh, 1978; Giard et al., 1973).
<b>Bezugsquelle:</b>	Prof. Dr. Opalka, Innere Klinik (Tumorforschung), Universitätsklinikum Essen.

**13 HTB-46 (CAKI-1)**

<b>Zelltyp:</b>	Zellen eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms (ICD-O-3 Code: 8312/6).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Niere (C64.9).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Metastase. Haut (C44.9).
<b>Patient:</b>	♂, 49 Jahre alt, „Caucasian“.
<b>Bemerkungen:</b>	Adhärent wachsende Zelllinie, die in halbfestem Medium Kolonien bildet. Die Zellen sind tumorigen in Nacktmäusen (Tax-ID: 10090) und in mit Steroiden behandelten Hamstern (Cricetinae, Tax-ID: 10026).
<b>Literaturstelle:</b>	(Fogh, 1975; Fogh et al., 1977b)
<b>Bezugsquelle:</b>	Prof. Dr. Opalka, Innere Klinik (Tumorforschung), Universitätsklinikum Essen.

**14 MCF7**

<b>Zelltyp:</b>	Adenokarzinomzellen (ICD-O-3 Code: 8141/6).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Mamma (C50.9)
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Metastase. Pleuraflüssigkeit (C38.4).
<b>Patient:</b>	♀, 69 Jahre alt, „Caucasian“.
<b>Bemerkungen:</b>	Adhärent wachsende Zelllinie. Östrogenrezeptor-positiver szirrhöser Subtyp eines Adenokarzinoms.
<b>Literaturstelle:</b>	(Soule et al., 1973; Sugarman et al., 1985).
<b>Bezugsquelle:</b>	Prof. Dr. Opalka, Innere Klinik (Tumorforschung), Universitätsklinikum Essen.

## 15 MG1

<b>Zelltyp:</b>	Zellen eines papillären Nierenzellkarzinoms (ICD-O-3 Code: 8260/3).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Niere (C64.9).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Primärtumor. Niere (C64.9).
<b>Patient:</b>	♀, 69 Jahre alt, „Caucasian“.
<b>Bemerkungen:</b>	Adhärent wachsende Zelllinie.
<b>Literaturstelle:</b>	Entfällt.
<b>Bezugsquelle:</b>	PD Dr. Rüdiger V. Sorg, Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ), Universitätsklinikum Düsseldorf.

## 16 MV3

<b>Zelltyp:</b>	Maligne Melanomzellen (ICD-O-3 Code: 8721/6).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Haut (C44.9).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Metastase. Haut (C44.9).
<b>Patient:</b>	♂, 76 Jahre alt, keine Angaben zur ethnischen Zugehörigkeit.
<b>Bemerkungen:</b>	Adhärent wachsende Zelllinie. Die Zellen wuchsen nach Inokulation in Nacktmäusen (Tax-ID: 10090).
<b>Literaturstelle:</b>	(van Muijen et al., 1991b).
<b>Bezugsquelle:</b>	Dr. Guido Swart, Department of Biomolecular Chemistry, Faculty of Science, Radboud University Nijmegen.

## 17 MZ2-MEL

<b>Zelltyp:</b>	Maligne Melanomzellen (ICD-O-3 Code: 8721/3).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Haut (C44.9).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Primärtumor. Haut (C44.9).
<b>Patient:</b>	Keine Angaben zu Geschlecht, Alter oder ethnischen Zugehörigkeit.
<b>Bemerkungen:</b>	Adhärent wachsende Zelllinie.
<b>Literaturstelle:</b>	(Gaugler et al., 1994).
<b>Bezugsquelle:</b>	Prof. Dr. Opalka, Innere Klinik (Tumorforschung), Universitätsklinikum Essen.

## 18 RB 15

<b>Zelltyp:</b>	Retinoblastomzellen (ICD-O-3 Code: 9510/3).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Retina (C69.2).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Primärtumor. Retina (C69.2).
<b>Bemerkungen:</b>	Adhärent wachsende Zelllinie. Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurde ein Zellpellet eingesetzt.
<b>Patient:</b>	11 Monate, keine Angaben zum Geschlecht u. ethnischer Zugehörigkeit.
<b>Literaturstelle:</b>	(Griegel et al., 1990).
<b>Bezugsquelle:</b>	Dr. Alexander Schramm, ONCO LAB, Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Zentrum für Kinderheilkunde, Universitätsklinikum Essen.

## 19 RB 247C3

<b>Zelltyp:</b>	Retinoblastomzellen (ICD-O-3 Code: 9510/3).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Retina (C69.2).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Primärtumor. Retina (C69.2).
<b>Patient:</b>	Keine Angaben zu Geschlecht, Alter oder ethnischer Zugehörigkeit.
<b>Bemerkungen:</b>	Adhärent wachsende Zelllinie. Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurde ein Zellpellet eingesetzt. Bilateraler Tumor. Zustand nach neoadjuvanter Radiatio.
<b>Literaturstelle:</b>	(Squire et al., 1985).
<b>Bezugsquelle:</b>	Dr. Alexander Schramm, ONCO LAB, Klinik für pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Zentrum für Kinderheilkunde, Universitätsklinikum Essen.



## 20 RB 355

<b>Zelltyp:</b>	Retinoblastomzellen (ICD-O-3 Code: 9510/3).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Retina (C69.2).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Primärtumor. Retina (C69.2).
<b>Patient:</b>	Keine Angaben zu Geschlecht, Alter oder ethnischer Zugehörigkeit.
<b>Bemerkungen:</b>	Adhärent wachsende Zelllinie. Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurde ein Zellpellet eingesetzt. Unilateraler Tumor.
<b>Literaturstelle:</b>	(Griegel et al., 1990; Squire et al., 1985).
<b>Bezugsquelle:</b>	Dr. Alexander Schramm, ONCO LAB, Klinik für pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Zentrum für Kinderheilkunde, Universitätsklinikum Essen.

## 21 RB 383

<b>Zelltyp:</b>	Retinoblastomzellen (ICD-O-3 Code: 9510/3).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Retina (C69.2).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Primärtumor. Retina (C69.2).
<b>Patient:</b>	Keine Angaben zu Geschlecht, Alter oder ethnischer Zugehörigkeit.
<b>Bemerkungen:</b>	Adhärent wachsende Zelllinie. Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurde ein Zellpellet eingesetzt. Unilateraler Tumor.
<b>Literaturstelle:</b>	(Squire et al., 1985).
<b>Bezugsquelle:</b>	Dr. Alexander Schramm, ONCO LAB, Klinik für pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Zentrum für Kinderheilkunde, Universitätsklinikum Essen.

## 22 RB Y79

<b>Zelltyp:</b>	Retinoblastomzellen (ICD-O-3 Code: 9510/3).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Retina (C69.2).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Primärtumor. Retina (C69.2).
<b>Patient:</b>	♀, 2,5 Jahr, „Caucasian“.
<b>Bemerkungen:</b>	Adhärent wachsende Zelllinie. Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurde ein Zellpellet eingesetzt. Unilateraler Tumor. Zustand nach neoadjuvanter Radiatio.
<b>Literaturstelle:</b>	(McFall et al., 1977; Reid et al., 1974).
<b>Bezugsquelle:</b>	Dr. Alexander Schramm, ONCO LAB, Klinik für pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Zentrum für Kinderheilkunde, Universitätsklinikum Essen.

## 23 RCC-1 (D-RC-1)

<b>Zelltyp:</b>	Zellen eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms (ICD-O-3 Code: 8312/3).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Niere (C64.9).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Primärtumor. Niere (C64.9).
<b>Patient:</b>	Keine Angaben zu Geschlecht, Alter oder ethnischer Zugehörigkeit.
<b>Bemerkungen:</b>	Adhärent wachsende Zelllinie. Zellen sind in vitro nicht seneszent, bilden Kolonien in Weichagar und sind tumorigen in Nacktmäusen (Tax-ID: 10090). Die sich bildenden Tumore ähneln histopathologisch den humanen klarzelligen renalen Karzinomen, denen sie entstammen.
<b>Literaturstelle:</b>	(Jülicher et al., 1997; Schattka et al., 1994; Werner et al., 2000).
<b>Bezugsquelle:</b>	Prof. Dr. Opalka, Innere Klinik (Tumorforschung), Universitätsklinikum Essen.

## 24 RPE

<b>Zelltyp:</b>	Pigmentepithelzellen (ICD-O-3 Code: Entfällt).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Retina (C69.2).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Retina (C69.2).
<b>Patient:</b>	Keine Angaben zu Geschlecht, Alter und ethnischer Zugehörigkeit.
<b>Bemerkungen:</b>	Adhärent wachsende Zelllinie.
<b>Literaturstelle:</b>	(Cinatl et al., 2000).
<b>Bezugsquelle:</b>	Dr. Jens-Uwe Vogel, Frankfurter Stiftung für krebskranke Kinder, Frankfurt am Main.

## 25 SK-MEL-28

<b>Zelltyp:</b>	Maligne Melanomzellen (ICD-O-3 Code: 8721/3).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Haut (C44.9).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Primärtumor. Haut (C44.9).
<b>Patient:</b>	♂, 51 Jahre alt, keine Angaben zur ethnischen Zugehörigkeit.
<b>Bemerkungen:</b>	Adhärent wachsende Zelllinie. Sie ist tumorigen in Nacktmäusen.
<b>Literaturstelle:</b>	(Fogh et al., 1977a).
<b>Bezugsquelle:</b>	Prof. Dr. Opalka, Innere Klinik (Tumorforschung), Universitätsklinikum Essen.

## 26 SN12c

<b>Zelltyp:</b>	Zellen eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms (ICD-O-3 Code: 8312/3).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Niere (C64.9).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Primärtumor. Niere (C64.9).
<b>Patient:</b>	♂, 43 Jahre alt, keine Angaben zur ethnischen Zugehörigkeit.
<b>Bemerkungen:</b>	Adhärent wachsende Zelllinie. Translokation t(3;8) mit Breaking-point im Bereich von 3p14 oder 3p21.
<b>Literaturstelle:</b>	(Lott et al., 1998; Lovell et al., 1999; Naito et al., 1986)
<b>Bezugsquelle:</b>	Prof. Dr. Opalka, Innere Klinik (Tumorforschung), Universitätsklinikum Essen.

## 27 Weri\_Rb1

<b>Zelltyp:</b>	Retinoblastomzellen (ICD-O-3 Code: 9510/3).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Retina (C69.2).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Primärtumor. Retina (C69.2).
<b>Patient:</b>	♀, 1 Jahr, „Caucasian“.
<b>Bemerkungen:</b>	Adhärent wachsende Zelllinie. Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurde ein Zellpellet eingesetzt.
<b>Literaturstelle:</b>	(McFall et al., 1977).
<b>Bezugsquelle:</b>	Dr. Alexander Schramm, ONCO LAB, Klinik für pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Zentrum für Kinderheilkunde, Universitätsklinikum Essen.

## 2.1.2 Gewebeproben

## 1 HNO1

<b>Gewebetyp:</b>	Supraglottisches Weichgewebe.
<b>Primärlokalisierung:</b>	Larynx (C32.1).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Larynx (C32.1).
<b>Patient:</b>	♂, 61 Jahre alt, keine Angaben zur ethnischen Zugehörigkeit. In die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden zwei Gewebeproben des Patienten eingesetzt: [a] Plattenepithelkarzinom (ICD-O-3 Code: 8070/3) und Stroma [b] Tumorfernes Gewebe
<b>Bemerkungen:</b>	Primärtumor: pT4N2cM0. Keine Angaben zum Grading. Neoadjuvante Radiatio (60Gy, 1 Monat). Keine Kulturgewinnung. Material direkt für molekularbiologische Analysen vorbereitet.
<b>Literaturstelle:</b>	Entfällt.
<b>Bezugsquelle:</b>	Prof. Dr. Fischer, Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Essen.

**2 HNO2**

<b>Gewebetyp:</b>	Weichgewebe aus dem Bereich der Tonsille und des weichen Gaumens.
<b>Primärlokalisierung:</b>	Tonsillenregion (C09.8).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Tonsillenregion (C09.8).
<b>Patient:</b>	♀, 54 Jahre alt, keine Angaben zur ethnischen Zugehörigkeit. In die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden zwei Gewebeproben der Patientin eingesetzt <b>[a]</b> Plattenepithelkarzinom (ICD-O-3 Code: 8070/3) und Stroma <b>[b]</b> Tumorfernes Gewebe.
<b>Bemerkungen:</b>	Primärtumor: pT3N2cM0, G2. Keine Kulturgewinnung. Material direkt für molekularbiologische Analysen vorbereitet.
<b>Literaturstelle:</b>	Entfällt.
<b>Bezugsquelle:</b>	Prof. Dr. Fischer, Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Essen.

**3 HNO3**

<b>Gewebetyp:</b>	Weichgewebe aus dem Bereich der Tonsille.
<b>Primärlokalisierung:</b>	Tonsille (C09.9).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Tonsille (C09.9).
<b>Patient:</b>	♂, 66 Jahre alt, keine Angaben zur ethnischen Zugehörigkeit. In die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden zwei Gewebeproben des Patienten eingesetzt: <b>[a]</b> Plattenepithelkarzinom (ICD-O-3 Code: 8070/3) und Stroma <b>[b]</b> Tumorfernes Gewebe.
<b>Bemerkungen:</b>	Primärtumor: pT3N2bM0. Ein Grading ist für Zustände nach Radio- und/oder Chemotherapie nicht definiert. Rezidivtumor. Zustand nach Chemotherapie und Radiatio. Keine Kulturgewinnung. Material direkt für molekularbiologische Analysen vorbereitet.
<b>Literaturstelle:</b>	Entfällt
<b>Bezugsquelle:</b>	Prof. Dr. Fischer, Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Essen.

**4 HNO4**

<b>Gewebetyp:</b>	Weichgewebe aus dem Bereich der Tonsille.
<b>Primärlokalisierung:</b>	Tonsille (C09.9).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Tonsille (C09.9).
<b>Patient:</b>	Keine Angaben zu Geschlecht, Alter oder ethnischer Zugehörigkeit (Material war aus Datenschutzgründen anonymisiert).
<b>Bemerkungen:</b>	Chronische Tonsillitis. Keine Kulturgewinnung. Material direkt für molekularbiologische Analysen vorbereitet.
<b>Literaturstelle:</b>	Entfällt.
<b>Bezugsquelle:</b>	Prof. Dr. Holger Sudhoff, Hals-Nasen-Ohren-Klinik der Ruhr-Universität Bochum, im St. Elisabeth-Krankenhaus, Bochum.

**5 HNO5**

<b>Gewebetyp:</b>	Weichgewebe aus dem Bereich der Tonsille.
<b>Primärlokalisierung:</b>	Tonsille (C09.9).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Tonsille (C09.9).
<b>Patient:</b>	Keine Angaben zu Geschlecht, Alter oder ethnischer Zugehörigkeit (Material war aus Datenschutzgründen anonymisiert).
<b>Bemerkungen:</b>	Chronische Tonsillitis. Keine Kulturgewinnung. Material direkt für molekularbiologische Analysen vorbereitet.
<b>Literaturstelle:</b>	Entfällt.
<b>Bezugsquelle:</b>	Prof. Dr. Holger Sudhoff, Hals-Nasen-Ohren-Klinik der Ruhr-Universität Bochum, im St. Elisabeth-Krankenhaus, Bochum.

**6 HNO6**

<b>Gewebetyp:</b>	Weichgewebe aus dem Bereich der Tonsille.
<b>Primärlokalisierung:</b>	Tonsille (C09.9).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Tonsille (C09.9).
<b>Patient:</b>	Keine Angaben zu Geschlecht, Alter oder ethnischer Zugehörigkeit (Material war aus Datenschutzgründen anonymisiert).
<b>Bemerkungen:</b>	Chronische Tonsillitis. Keine Kulturgewinnung. Material direkt für molekularbiologische Analysen vorbereitet.
<b>Literaturstelle:</b>	Entfällt.
<b>Bezugsquelle:</b>	Prof. Dr. Holger Sudhoff, Hals-Nasen-Ohren-Klinik der Ruhr-Universität Bochum, im St. Elisabeth-Krankenhaus, Bochum.

**2.1.3 RNA-Proben****1 Human Kidney Total RNA**

<b>Gewebetyp:</b>	Epitheliales und mesenchymales Gewebe (ICD-O-3 Code: Entfällt).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Niere (C64.9).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Niere (C64.9).
<b>Patient:</b>	♀, 40 Jahre, kaukasisch.
<b>Bemerkungen:</b>	Adrenales Drüsengewebe wurde entfernt. Gesamt-RNA direkt für molekularbiologische Analysen aufgearbeitet.
<b>Literaturstelle:</b>	(Christmas et al., 2001).
<b>Bezugsquelle:</b>	Clontech Laboratories Inc. (Tab 2.2, S.31)

**2 HFF**

<b>Zelltyp:</b>	Fibroblasten (ICD-O-3 Code: Entfällt).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Präputium (C60.0).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Präputium (C60.0).
<b>Patient:</b>	♂. Keine Angaben zu Alter oder ethnischer Zugehörigkeit (Material war aus Datenschutzgründen anonymisiert). In die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden zwei RNA-Proben eingesetzt <div style="margin-left: 40px;"> <b>[a]</b> Mit CMV-Laborstamm MOI 2 und  <b>[b]</b> Nicht infizierte Kontrollpräparate. </div>
<b>Bemerkungen:</b>	Gesamt-RNA direkt für molekularbiologische Analysen aufgearbeitet.
<b>Literaturstelle:</b>	(Cinatl et al., 2000).
<b>Bezugsquelle:</b>	Dr. Jens-Uwe Vogel, Frankfurter Stiftung für krebskranke Kinder, Frankfurt am Main.

**3 Total RNA Adult Human Parotid**

<b>Gewebetyp:</b>	Epitheliales und mesenchymales Gewebe (ICD-O-3 Code: Entfällt).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Glandula parotidea (C07.9)
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Glandula parotidea (C07.9).
<b>Patient:</b>	♀, 36 Jahre, Keine Angaben zur ethnischen Zugehörigkeit.
<b>Bemerkungen:</b>	Gesamt-RNA direkt für molekularbiologische Analysen aufgearbeitet.
<b>Literaturstelle:</b>	Entfällt.
<b>Bezugsquelle:</b>	Stratagene (Tab 2.2, S.31).

**4 RPE**

<b>Gewebetyp:</b>	Pigmentepithelzellen (ICD-O-3 Code: Entfällt).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Retina (C69.2).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Retina (C69.2).
<b>Patient:</b>	Keine Angaben zu Geschlecht, Alter oder ethnischer Zugehörigkeit.
<b>Bemerkungen:</b>	In die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden fünf RNA-Proben eingesetzt: <b>[a]</b> Mit CMV-Patientenstamm (MOI 1; für 2 h), <b>[b]</b> Mit CMV-Patientenstamm (MOI 1; für 4 h), <b>[c]</b> Mit CMV-Patientenstamm (MOI 1; für 8 h), <b>[d]</b> Mit CMV-Patientenstamm (MOI 1; für 24 h) infizierte und <b>[e]</b> Nicht infizierte Kontrollpräparate. Gesamt-RNA direkt für molekularbiologische Analysen aufgearbeitet.
<b>Literaturstelle:</b>	Entfällt.
<b>Bezugsquelle:</b>	Dr. Jens-Uwe Vogel, Frankfurter Stiftung für krebskranke Kinder, Frankfurt.

**5 Total RNA Adult Human Tongue**

<b>Gewebetyp:</b>	Epitheliales und mesenchymales Gewebe (ICD-O-3 Code: Entfällt).
<b>Primärlokalisation:</b>	Zunge (C02.9).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Zunge (C02.9).
<b>Patient:</b>	♀, 62 Jahre und ♂, 73 Jahre alt, jeweils keine Angaben zur ethnischen Zugehörigkeit.
<b>Bemerkungen:</b>	Gepoolte Gesamt-RNA direkt für molekularbiologische Analysen aufgearbeitet.
<b>Literaturstelle:</b>	Entfällt.
<b>Bezugsquelle:</b>	Stratagene (Tab 2.2, S.31).

**2.1.4 cDNA-Proben****1 Human Fetal Normal Tissue: Brain**

<b>Gewebetyp:</b>	Neuroepitheliales und mesenchymales Gewebe (ICD-O-3 Code: Entfällt).
<b>Primärlokalisation:</b>	Gehirn (C71.9).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Gehirn (C71.9).
<b>Patient:</b>	Jeweils keine Angaben zu Geschlecht, Alter und zur ethnischen Zugehörigkeit.
<b>Bemerkungen:</b>	cDNA aus gepoolter Gesamt-RNA direkt für molekularbiologische Analysen aufgearbeitet.
<b>Literaturstelle:</b>	Entfällt.
<b>Bezugsquelle:</b>	BioChain Institute (Tab 2.2, S.31).

**2 Human Adult Normal Tissue: Kidney**

<b>Gewebetyp:</b>	Epitheliales und mesenchymales Gewebe (ICD-O-3 Code: Entfällt).
<b>Primärlokalisation:</b>	Niere. (C64.9)
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Niere. (C64.9).
<b>Patient:</b>	Jeweils keine Angaben zu Geschlecht, Alter und zur ethnischen Zugehörigkeit.
<b>Bemerkungen:</b>	cDNA aus gepoolter Gesamt-RNA direkt für molekularbiologische Analysen aufgearbeitet.
<b>Literaturstelle:</b>	Entfällt.
<b>Bezugsquelle:</b>	BioChain Institute (Tab 2.2, S.31).

**3 Human Adult Normal Tissue: Lung**

<b>Gewebetyp:</b>	Epitheliales und mesenchymales Gewebe (ICD-O-3 Code: Entfällt).
<b>Primärlokalisation:</b>	Pulmo (C34.9).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Pulmo (C34.9).
<b>Patient:</b>	Jeweils keine Angaben zu Geschlecht, Alter und zur ethnischen Zugehörigkeit.
<b>Bemerkungen:</b>	cDNA aus gepoolter Gesamt-RNA direkt für molekularbiologische Analysen aufgearbeitet.
<b>Literaturstelle:</b>	Entfällt.
<b>Bezugsquelle:</b>	BioChain Institute (Tab 2.2, S.31).

**4 UD-(Universitätsklinikum Düsseldorf)-SCC 2**

<b>Zelltyp:</b>	Plattenepithelkarzinom (ICD-O-3 Code: 8070/3).
<b>Primärlokalisation:</b>	Hypopharynx (C13.9).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Primärtumor. Hypopharynx (C13.9).
<b>Patient:</b>	Jeweils keine Angaben zu Geschlecht, Alter oder ethnischer Zugehörigkeit (Material war aus Datenschutzgründen anonymisiert).
<b>Bemerkungen:</b>	cDNA aus Gesamt-RNA der Zelllinie wurde direkt für molekularbiologische Analysen aufgearbeitet.
<b>Literaturstelle:</b>	(Balló et al., 1999; Hauser et al., 2002).
<b>Bezugsquelle:</b>	Dr. Vera Balz, Hals-Nasen- und Ohrenklinik, Forschungslabor (Tumorforschung), Universitätsklinikum Düsseldorf.

**5 UD-(Universitätsklinikum Düsseldorf)-SCC 5**

<b>Zelltyp:</b>	Plattenepithelkarzinom (ICD-O-3 Code: 8070/3).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Larynx (C32.1).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Primärtumor. Larynx (C32.1).
<b>Patient:</b>	♂, 44 Jahre, keine Angaben zur ethnischen Zugehörigkeit.
<b>Bemerkungen:</b>	pT1N1. Keine Angaben zum Grading. cDNA aus Gesamt-RNA der Zelllinie wurde direkt für molekularbiologische Analysen aufgearbeitet.
<b>Literaturstelle:</b>	(Balló et al., 1999; Hauser et al., 2002).
<b>Bezugsquelle:</b>	Dr. Vera Balz, Hals-Nasen- und Ohrenklinik, Forschungslabor (Tumorforschung), Universitätsklinikum Düsseldorf.

**6 UD-(Universitätsklinikum Düsseldorf)-SCC 8**

<b>Zelltyp:</b>	Plattenepithelkarzinom (ICD-O-3 Code: 8070/3).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Larynx (C32.1).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Primärtumor. Larynx (C32.1).
<b>Patient:</b>	♂, 43 Jahre, keine Angaben zur ethnischen Zugehörigkeit.
<b>Bemerkungen:</b>	cDNA aus Gesamt-RNA der Zelllinie wurde direkt für molekularbiologische Analysen aufgearbeitet.
<b>Literaturstelle:</b>	(Balló et al., 1999; Hauser et al., 2002).
<b>Bezugsquelle:</b>	Dr. Vera Balz, Hals-Nasen- und Ohrenklinik, Forschungslabor (Tumorforschung), Universitätsklinikum Düsseldorf.

**7 UT (Turun Yliopisto, Universität zu Turku)-SCC 9**

<b>Zelltyp:</b>	Plattenepithelkarzinom (ICD-O-3 Code: 8070/3).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Larynx (C32.1).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Primärtumor. Larynx (C32.1).
<b>Patient:</b>	♂, 81 Jahre, keine Angaben zur ethnischen Zugehörigkeit.
<b>Bemerkungen:</b>	pT2N1M0. Keine Angaben zum Grading. cDNA aus Gesamt-RNA der Zelllinie wurde direkt für molekularbiologische Analysen aufgearbeitet.
<b>Literaturstelle:</b>	(Balló et al., 1999; Hauser et al., 2002).
<b>Bezugsquelle:</b>	Dr. Vera Balz, Hals-Nasen- und Ohrenklinik, Forschungslabor (Tumorforschung), Universitätsklinikum Düsseldorf.

**8 UD-(Universitätsklinikum Düsseldorf)-SCC 7A**

<b>Zelltyp:</b>	Plattenepithelkarzinom (ICD-O-3 Code: 8070/3).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Vallecula (C10.0).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Primärtumor. Vallecula (C10.0).
<b>Patient:</b>	♂, 71 Jahre, keine Angaben zur ethnischen Zugehörigkeit.
<b>Bemerkungen:</b>	pT2N2bM0. Keine Angaben zum Grading. cDNA aus Gesamt-RNA der Zelllinie wurde direkt für molekularbiologische Analysen aufgearbeitet.
<b>Literaturstelle:</b>	(Balló et al., 1999; Hauser et al., 2002).
<b>Bezugsquelle:</b>	Dr. Vera Balz, Hals-Nasen- und Ohrenklinik, Forschungslabor (Tumorforschung), Universitätsklinikum Düsseldorf.

**9 UM (University of Michigan, Universität zu Michigan)-SCC 10A**

<b>Zelltyp:</b>	Plattenepithelkarzinom (ICD-O-3 Code: 8070/3).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Larynx (C32.1).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Primärtumor. Larynx (C32.1).
<b>Patient:</b>	♂, 57 Jahre, keine Angaben zur ethnischen Zugehörigkeit.
<b>Bemerkungen:</b>	pT3N1M0. Keine Angaben zum Grading. cDNA aus Gesamt-RNA der Zelllinie wurde direkt für molekularbiologische Analysen aufgearbeitet.
<b>Literaturstelle:</b>	(Balló et al., 1999; Hauser et al., 2002).
<b>Bezugsquelle:</b>	Dr. Vera Balz, Hals-Nasen- und Ohrenklinik, Forschungslabor (Tumorforschung), Universitätsklinikum Düsseldorf.

**10 UM (University of Michigan, Universität zu Michigan)-SCC 17A**

<b>Zelltyp:</b>	Plattenepithelkarzinom (ICD-O-3 Code: 8070/3).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Larynx (C32.1).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Primärtumor. Larynx (C32.1).
<b>Patient:</b>	♀, 48 Jahre, keine Angaben zur ethnischen Zugehörigkeit.
<b>Bemerkungen:</b>	pT1N0. Keine Angaben zum eventuellen Vorliegen von Fernmetastasen (M-Kategorie). Keine Angaben zum Grading. cDNA aus Gesamt-RNA der Zelllinie wurde direkt für molekularbiologische Analysen aufgearbeitet.
<b>Literaturstelle:</b>	(Balló et al., 1999; Hauser et al., 2002).
<b>Bezugsquelle:</b>	Dr. Vera Balz, Hals-Nasen- und Ohrenklinik, Forschungslabor (Tumorforschung), Universitätsklinikum Düsseldorf.

**11 NHEK $\alpha$** 

<b>Zelltyp:</b>	Keratinocyten (ICD-O-3 Code: Entfällt).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Präputium (C60.0).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Präputium (C60.0).
<b>Patient:</b>	♂, 3 Jahre, keine Angaben zur ethnischen Zugehörigkeit.
<b>Bemerkungen:</b>	cDNA aus Gesamt-RNA der Zelllinie wurde direkt für molekularbiologische Analysen aufgearbeitet.
<b>Literaturstelle:</b>	(Balló et al., 1999; Hauser et al., 2002).
<b>Bezugsquelle:</b>	Dr. Vera Balz, Hals-Nasen- und Ohrenklinik, Forschungslabor (Tumorforschung), Universitätsklinikum Düsseldorf.

**12 NHEK $\beta$** 

<b>Zelltyp:</b>	Keratinocyten (ICD-O-3 Code: Entfällt).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Präputium (C60.0).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Präputium (C60.0).
<b>Patient:</b>	♂, 5 Jahre, keine Angaben zur ethnischen Zugehörigkeit.
<b>Bemerkungen:</b>	cDNA aus Gesamt-RNA der Zelllinie wurde direkt für molekularbiologische Analysen aufgearbeitet.
<b>Literaturstelle:</b>	(Balló et al., 1999; Hauser et al., 2002).
<b>Bezugsquelle:</b>	Dr. Vera Balz, Hals-Nasen- und Ohrenklinik, Forschungslabor (Tumorforschung), Universitätsklinikum Düsseldorf.

**13 NHEK $\gamma$** 

<b>Zelltyp:</b>	Keratinocyten (ICD-O-3 Code: Entfällt).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Präputium (C60.0).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Präputium (C60.0).
<b>Patient:</b>	♂, 2 Jahre, keine Angaben zur ethnischen Zugehörigkeit.
<b>Bemerkungen:</b>	cDNA aus Gesamt-RNA der Zelllinie wurde direkt für molekularbiologische Analysen aufgearbeitet.
<b>Literaturstelle:</b>	(Balló et al., 1999; Hauser et al., 2002).
<b>Bezugsquelle:</b>	Dr. Vera Balz, Hals-Nasen- und Ohrenklinik, Forschungslabor (Tumorforschung), Universitätsklinikum Düsseldorf.

**14 TuFi 28/01**

<b>Zelltyp:</b>	Stromazellen (ICD-O-3 Code: Entfällt).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Unbekannt (C80.9).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Unbekannt (C80.9).
<b>Patient:</b>	Keine Angaben zu Geschlecht, Alter oder ethnischer Zugehörigkeit (Material war aus Datenschutzgründen anonymisiert).
<b>Bemerkungen:</b>	Die Zelllinie entstammt der mesenchymalen Reaktion auf ein Plattenepithelkarzinom (ICD-O-3 Code: 8070/9). Die mutmaßliche Fibroblasten-cDNA (gewonnen aus Gesamt-RNA) wurde direkt für molekularbiologische Analysen aufgearbeitet.
<b>Literaturstelle:</b>	(Balló et al., 1999; Hauser et al., 2002).
<b>Bezugsquelle:</b>	Dr. Vera Balz, Hals-Nasen- und Ohrenklinik, Forschungslabor (Tumorforschung), Universitätsklinikum Düsseldorf.

## 15 TuFi 35/01

<b>Zelltyp:</b>	Stromazellen (ICD-O-3 Code: Entfällt).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Unbekannt (C80.9).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Unbekannt (C80.9).
<b>Patient:</b>	Keine Angaben zu Geschlecht, Alter oder ethnischer Zugehörigkeit (Material war aus Datenschutzgründen anonymisiert).
<b>Bemerkungen:</b>	Die Zelllinie entstammt der mesenchymalen Reaktion auf ein Plattenepithelkarzinom (ICD-O-3 Code: 8070/9). Die mutmaßliche Fibroblasten-cDNA (gewonnen aus Gesamt-RNA) wurde direkt für molekularbiologische Analysen aufgearbeitet.
<b>Literaturstelle:</b>	(Balló et al., 1999; Hauser et al., 2002).
<b>Bezugsquelle:</b>	Dr. Vera Balz, Hals-Nasen- und Ohrenklinik, Forschungslabor (Tumorforschung), Universitätsklinikum Düsseldorf.

## 2.1.5 Genomische DNA: Plazenta-DNA

<b>Gewebetyp:</b>	Zellen einer Plazenta (ICD-O-3 Code: Entfällt).
<b>Primärlokalisierung:</b>	Plazenta (C58.9).
<b>Entnahmelokalisation:</b>	Plazenta (C58.9).
<b>Patient:</b>	♀. Keine Angaben zu Alter oder ethnischer Zugehörigkeit.
<b>Bemerkungen:</b>	Für molekularbiologische Analysen aufgearbeitete genomische DNA.
<b>Literaturstelle:</b>	Entfällt.
<b>Bezugsquelle:</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Tab 2.2, S.31).

## 2.1.6 Bakterienstämme E.coli (Tax-ID: 562)

Bakterienstamm	Firma (Tab 2.2, S.31)	Genotyp
Subcloning Efficiency <sup>®</sup> DH5α <sup>®</sup> Chemically Competent E.coli	35	F <sup>-</sup> φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) phoA supE44 λ <sup>-</sup> thi-1 gyrA96 relA1
One Shot <sup>®</sup> TOP10F <sup>+</sup> Chemically Competent E.coli	35	F' <sup>+</sup> {lacI <sup>q</sup> , Tn10(Tet <sup>R</sup> )} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str <sup>R</sup> ) endA1 nupG

Die Bakterien wurden zu 50µl aliquotiert, bei -70°C wiedereingefroren und nach Bedarf verwendet.

## 2.1.7 Vektoren

Vektor	Firma (Tab 2.2, S.31)	Eigenschaften
PCDNA3.1ZEO(+)	35	Eukaryontischer Expressionsvektor mit CMV-Promotor (Sequenzlänge: 5015bp).
PCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO-Vektor	35	Vektor mit 3'T-Überhang zur direkten Ligation mit Taq-amplifizierten PCR-Produkten.
PCDNA3.1ZEO(+)-IRES-EGFP		Eukaryontischer Expressionsvektor mit CMV-Promotor und IRES-EGFP-Sequenz (interner ribosomaler Eintrittsstelle, internal ribosomal entry site, Enhanced green fluorescent protein). Dr. W. Bardenheuer, Universitätsklinikum Essen (Abb 67). Die Verwendung einer IRES kann eine sehr hohe Koexpression einer Vielzahl von Transgenen verursachen.



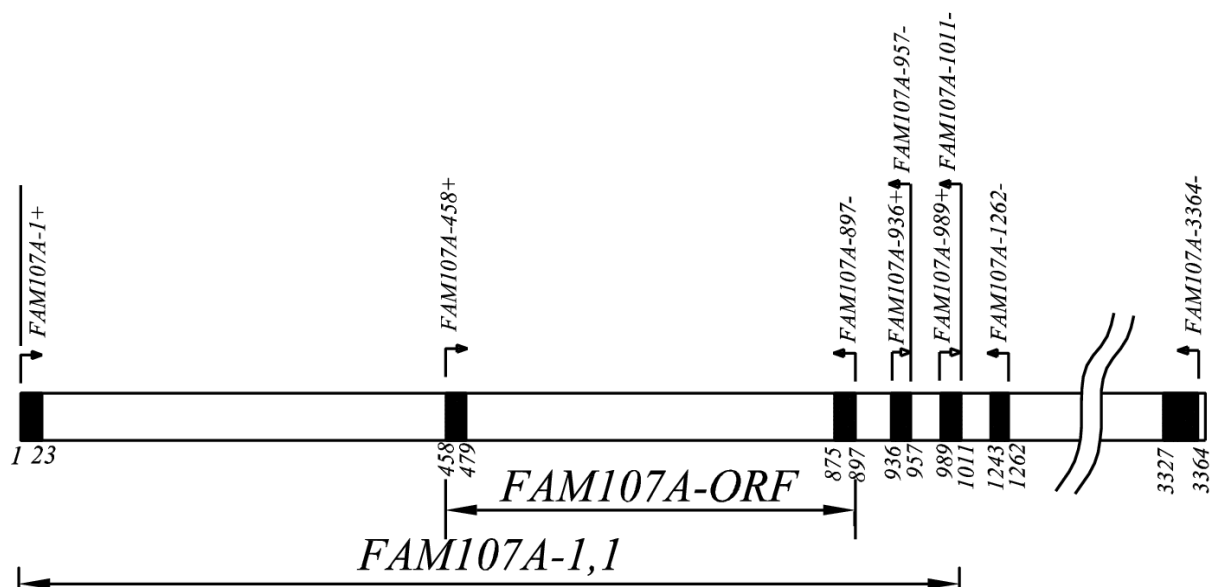
### 2.1.8 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden als Startermoleküle, in weiterer Arbeit als Primer bezeichnet, für die Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) benötigt. Die spezifischen Oligonukleotid-Sequenzen wurden mittels der Datenbank Nucleotide, NCBI (Wheeler et al., 2000) ausgewählt (*Abb 6, Tab 8.7, S.151*). Die Spezifität der Oligonukleotid-Sequenzen wurde mit dem Computerprogramm „blastn“ überprüft (Zhang et al., 2000). Sämtliche Oligonukleotide wurden von zwei Bezugsquellen bezogen (35, 44, *Tab 2.2, S.31*). Die Schmelztemperaturen ( $T_M$ ) der Oligonukleotide wurden nach folgender Formel (Suggs et al., 1981) berechnet:

$$T_M = [(A + T) \cdot 2^\circ\text{C}] + [(G + C) \cdot 4^\circ\text{C}]$$

Die Anlagerungstemperatur (Annealingtemperatur) wurde jeweils gewählt nach der Faustregel „ $T_M - 5$ “ und durch die Wahl unterschiedlicher Annealingtemperaturen bei der Durchführung der PCR optimiert. Die hier verwendete Bezeichnung der Oligonukleotide setzt sich wie folgt zusammen:

- Genname beziehungsweise Name der Nukleotidsequenz (z.B. FAM107A-458+).
- Zahlenangabe der 5'-Base des Primers bezogen auf die Position in der Referenzsequenz (z.B. FAM107A-458+).
- Richtung der Verlängerung bei der PCR: „+“ für „VorwärtsPrimer“ (sense), „-“ für „RückwärtsPrimer“ (antisense; z.B. FAM107A-458+).



**Abb 6: FAM107A-spezifische Primer.** Die Abbildung gibt einen Überblick über die Referenzsequenz FAM107A, NM\_001076778 (3.367bp) mit den Angaben der Basenpaare, an denen sich die Primer (*Tab 8.7, S.151*) anlagern. Die schwarzen Balken zeigen die Primerlänge mit Angabe der Position der korrespondierenden Anfangs- und Endnukleotidsequenz des Primers. Markiert sind die Sequenzen, die für den FAM107A-ORF-Vektor und für den FAM107A-1,1-Vektor verwendet wurden.

Die Oligonukleotide wurden in Wasser (H<sub>2</sub>O) aufgenommen (Endkonzentration der Stammlösung 100pmol/μl) und bei -20°C gelagert.

### 2.1.9 Chemikalien

Die verwendeten Materialien wurden in p.A.-Qualität verwendet. Für Chargennummern der verwendeten Chemikalien wird auf die entsprechenden Einträge zu den durchgeführten Versuchen in den Laborbüchern verwiesen.

Chemikalie	Firma (Tab 2.2)	CAS-Nr
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	58	91-95-2
5-Aza-2'-desoxycytidin	58	2353-33-5
Agarose	10	9012-36-6
Albumin vom Rinderserum, mind. 96%, für die Elektrophorese	58	9048-46-8
Ampicillin (Binotal <sup>®</sup> )	4	69-53-4
Ampuva	3	7732-18-5
Bacto-Agar	20	9002-18-0
Bromphenolblau	57	34725-61-6
Bovines Serumalbumin (BSA)	24	9048-46-8
Cisplatinlösung 1mg/ml (Platinex <sup>®</sup> )	14	15663-27-1
Colcemid	58	477-30-5
4',6-Diamidino-2-phenylindol dihydrochlorid (DAPI)	58	28718-90-3
Dimethylsulfoxid (DMSO)	58	67-68-5
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-beta-d-galactopyranosid (X-Gal)	12	7240-90-6
Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumdihydrat (EDTA)	15	6381-92-6
Ethanol	54	64-17-5
Ethidiumbromid	58	1239-45-8
Formaldehyd 37%(w/v)	58	50-00-0
Giemsa	58	51811-82-6
Glycerin	58	56-81-5
Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosid, IPTG	58	367-93-1
Isopropanol	58	67-63-0
Kaliumchlorid, KCl	14	7447-40-7
LB Broth Base	35	keine Angabe
LB Agar Lennox L	35	keine Angabe
Methanol	58	67-56-1
Mineralöl	58	8042-47-5
Poly-L-Lysin-Lösung	58	25988-63-0
Propidiumjodid	58	25535-16-4
Saponin	58	8047-15-2
Thymidin	58	50-89-5
Trichostatin A	58	58880-19-6
Tris(hydroxy-d-methyl)amino-d <sub>2</sub> -methan	42	207802-44-6
Xylencyanol	16	2650-17-1
Zeocin <sup>®</sup> 100mg/ml	35	11006-33-0

### 2.1.10 Molekulargewichtstandards

Molekulargewichtsstandard	Firma (Tab 2.2)
GeneRuler <sup>®</sup> 50bp-DNA-Leiter	23
123bp-Leiter	35
1kb-Leiter	35
100bp-Leiter	25
100bp-Leiter	26
Lambda-Hind-III-Fragmente	35
MassRuler <sup>®</sup> DNA-Leiter, Mix	23
SeeBlue <sup>®</sup> Plus2-Standard	35

### 2.1.11 Verwendete Puffer und Lösungen, Medien für die Zellkultur

Puffer, Lösung, Medium	Firma (Tab 2.2)	Herstellung
Agarplatten (100µg/µl Ampicillin)		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 12,8g LB Agar Lennox L + 400ml Ampuwa; autoklavieren</li> <li>- auf 50°C im Wasserbad abkühlen</li> <li>- nach Zugabe von 800µl Ampicillin (50µg/µl) ausgießen in 13-20 Platten</li> <li>- Nach dem Abkühlen in Folie wickeln</li> </ul>
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), +4500mg/L Glucose, + L-Glutamin, - Pyruvat	35	
Entellan® Neu	42	
Fetales Rinderserum (Fetal calf serum, FCS)	35	30min bei 57°C im Wasserbad inaktivieren
<sup>3</sup> H-Thymidin-Lösung	25	
Hanks' Salzlösung	8	
Iscove's Modified Dulbecco's Medium, IMDM	35	
Lambda DNA (500µg/ml)	25	
LB-Amp-Medium		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 8g LB Broth Base + 400ml Ampuwa, autoklavieren</li> <li>- nach Abkühlen + 400µl Ampicillin (100µg/µl), Endkonzentration von 100µg/ml</li> </ul>
L-Glutamin 200mM	35	
Lipofectamine®	35	
Novex® Tris-Glycin SDS Probenpuffer (2X)	35	
Novex® Tris-Glycin SDS Laufpuffer (10X)	35	
Novex® Zymogram Renaturierungspuffer (10X)	35	
Novex® Zymogram Entwicklungspuffer (10X)	35	
Nukleotidmix Desoxynukleotid Triphosphat Set, PCR Grad	55	je 12,5µl dATP, dGTP, dCTP, dTTP (je 100mM) + 450µl H <sub>2</sub> O, Endkonzentration 2,5mM
Oligo-dT(12-18)	25	
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate-Buffered Saline, PBS)	28	
Penicillin/Streptomycin (P/S)	35	
Permeabilisierungslösung		PBS + 0,5% Saponin + 3% BSA
PI-Färbelösung (50µg/ml)		50ml PBS + 1,25ml Propidiumjodid Stammlösung (2mg/ml) + 250µl Rnase A (10mg/ml, diese vor Zugabe 5min bei 95°C kochen)
Puffer-1		PBS + 0,2% BSA
Puffer-2		PBS + 0,1% Saponin + 3% BSA
RNAlater® RNA Stabilisierungslösung	53	
RNA-Probenpuffer (5X)		2,5% (w/v) Bromphenolblau + 2,5% (w/v) Xylencyanol + 1mM EDTA
RPMI 1640	35	
S1-EF-Puffer	40	
S2-EF-Puffer	40	
S3-EF-Puffer	40	
SOC Medium	35	
Szintillationslösung Betaplate Scint®	63	
TAE, 50X		242g/l Tris + 57,1ml/l Eisessig + 50mM EDTA auf pH 8,5 einstellen

Puffer, Lösung, Medium	Firma (Tab 2.2)	Herstellung
TE-Puffer (Tris EDTA)	53	
Trizol <sup>®</sup>	35	
Trypanblau Blau 0,5% in 0,9% Kochsalzlösung	35	
Zelldissoziationspuffer	28	

### 2.1.12 Antikörper

Antikörper	Firma (Tab 2.2)
Anti-humaner Survivin-Fluorescein Monoklonaler Antikörper	52
Anti-Humaner Ki-67/FITC Klon MIB-1, Code No. F 7268, Monoklonaler Antikörper	19
Anti-humaner Ki-67/Mib1-Antigen Antikörper, Monoklonaler Mausantikörper	19
Maus Ig G1 Immunglobulin	52
HLA-ABC FITC Antikörper	5
HLA-DR PC5 Antikörper	5
RNase Out <sup>®</sup> , Ribonuklease Inhibitor (20-40units/μl)	25
RNaseOUT <sup>®</sup> Rekombinanter Ribonuklease Inhibitor (40units/μl)	35

### 2.1.13 Enzyme

Bei einigen Enzymen war keine CAS-Nummer verfügbar. Hier erfolgte die Einordnung mittels der Enzyme Commission Nummer, gekennzeichnet durch „EC“ vor der Zahlenangabe.

Enzym	Firma (Tab 2.2)	CAS-Nr
DNase I (1unit/μl)	35	9003-98-9
RNase-Free DNase Set (1500 Kunitz units) (Kunitz, 1950)	53	9003-98-9
M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transkriptase (200units/μl)	35	9068-38-6
MMP2, Gelatinase A, 72 Kd Gelatinase	58	EC 3.4.24.24
Omniscript Reverse Transkriptase (4units/μl)	53	EC 2.7.7.49
Restriktionsenzym AatII (20units/μl)	47	152766-92-2
Restriktionsenzym EcoRI (10units/μl)	35	80498-17-5
Restriktionsenzym Hind III	55	81295-22-9
Restriktionsenzym Not I	26	103780-20-7
Restriktionsenzym XbaI (10units/μl)	35	81295-42-3
RNase A (50-100 Kunitz units/mg Protein)	58	9001-99-4
SuperScript <sup>®</sup> II RT (200units/μl)	35	EC 2.7.7.49
T4-DNA-Ligase (400units/μl, bei kohäsiven Enden)	47	9015-85-4
Taq polymerase (5units/μl)	55	9012-90-2
Biotherm <sup>®</sup> Taq Polymerase (5units/μl)	26	EC 2.7.7.7
Hot Star Taq (5units/μl)	53	EC 2.7.7.7
Trypsin (10X)	35	9002-07-7

### 2.1.14 Verwendete Kits

Kit	Firma (Tab 2.2)
DNeasy <sup>®</sup> Tissue Kit	53
Endo Free Plasmid Maxi Kit	53
GFX <sup>®</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit	25
Nucleobond <sup>®</sup> EF Maxi	40
Nucleobond <sup>®</sup> EF Mini Kits	40
QIAquick <sup>®</sup> PCR Purification Kit	53
QuickPrep <sup>™</sup> Total RNA Extraction Kit	25
RNeasy <sup>®</sup> Micro Kit	53

Kit	Firma (Tab 2.2)
RNeasy <sup>®</sup> Mini Kit	53
RNeasy <sup>®</sup> Plus Mini	53
TOPO TA Cloning <sup>®</sup> Kit	35
Trizol <sup>®</sup>	35

### 2.1.15 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Firma (Tab 2.2)
Chamberslides	49
Einmalspritzen, 1ml	3
Sterican <sup>®</sup> G20 x 2" SB, 0,90x50mm	3
Eppendorfgefäße 1,5ml; 2ml	22
Facsröhrchen	30
BD Falcon <sup>®</sup> 15ml, 50ml	6
Pasteurpipetten aus Glas	13
Kryoröhrchen	49
Novex <sup>®</sup> 10% Zymogram (Gelatine) 1.0mm, 15well	35
Polaroidfilm Typ 667 ISO3000/DIN36	51
UV-(Ultraviolett)-Küvette mikro 70µl, Einmalküvetten	13
Zellkulturflaschen, 25cm <sup>2</sup> (T25-Flasche), 75cm <sup>2</sup> (T75-Flasche)	61
Zellkulturplatten, 6-Loch, 24-Loch, 96-Loch	61
Zellkulturschalen, 150x20mm, 150x20mm	61

### 2.1.16 Geräte

Gerät	Firma (Tab 2.2)
1.450 Mikrobeta Trilux Messgerät	63
Autoklav D150	60
AxioCam MRc5 Mikroskopkamera	17
Axioskop 2 Mikroskop	17
CO <sub>2</sub> -Inkubator NU 2.700 E	48
DNA Engine MJ Research PTC-200, Peltier Thermal Cycler	10
Durchflusszytometer EPICS XL	5
Gefrierschrank -70°C	56
Gelelektrophorese-Einheit Standard Power Pack P24 und P25	9
Gilson-Pipetten 20µl, 200µl, 1.000µl	29
Hettich Rotixa RP Zentrifuge	32
Inkubator 37°C INB 200	35
Inkubator Shaker Modell G25	41
Julabo Einhängethermostat E + Badgefäß	36
Kamera Leica	38
Knick pH-Meter 761, Calimetic	34
Mikroskop Leica Dialux 20 EB	39
Nalgene Cryo 1°C Freezing Container	45
Neubauer-Zählkammer	27
NexES <sup>®</sup> ICH Automat	62
Phasenkontrastinversionsmikroskop CK2	50
Photometer Lightwave S2000, UV/Vis Diode-Array-Spektrophotometer	64
Pipetus-akku, P 990 7001/0294	33
MP4 Land Camera, Polaroidkamera/UV-Analyse-Einheit	43
Präzisionswaage AE120	11
Sicherheitswerkbank NU4400-400E	48
Tischzentrifuge Eppendorf 5415 C	22
Trio Thermoblock und Uno Thermoblock	9
Trockensterilisator	41
Vortexer Reax 2000	31
Wasserbad Julabo 5B	36
Zentrifuge Hettich Rotixa RP	32

Tab 2.2: Übersicht der Firmen

	Firma
1	Applied Spectral Imaging, GmbH, Edingen Neckarhausen, Deutschland
2	ATCC, Manassas, VA, USA
3	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
4	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
5	BeckmanCoulter GmbH, Krefeld, Deutschland
6	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
7	BioChain Institute, Inc., Hayward, CA, USA
8	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
9	Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland
10	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
11	Bosch + Sohn GmbH u. Co. KG, Jungingen, Deutschland
12	BioVectra DCL, Connecticut, USA
13	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland
14	Bristol-Myers-Squibb GmbH, München, Deutschland
15	Calbiochem, Merck, Darmstadt, Deutschland
16	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
17	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
18	Clontech Laboratories Inc., Mountain View, CA, USA
19	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
20	Difco Laboratories Inc., Detroit Michigan, USA
21	DSMZ GmbH AG Molekularbiologie, Braunschweig, Deutschland
22	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
23	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
24	Fluka Biochemika/Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
25	GE HealthCare Europe, München, Deutschland
26	Genecraft GmbH, Lüdinghausen, Deutschland
27	Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Würzburg, Deutschland
28	Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA
29	Gilson, Villers-le-Bel, Frankreich
30	Greiner Bio One International AG, Frickenhausen, Deutschland
31	Heidolph Elektro GmbH & Co KG, Kelheim, Deutschland
32	Hettich Zentrifugen GmbH & Co KG, Tuttlingen, Deutschland
33	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co KG, Eberstadt, Deutschland
34	Ingold Messtechnik GmbH, Steinbach, Deutschland
35	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
36	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
37	Kodak GmbH, Stuttgart, Deutschland
38	Leica Camera AG, Solms, Deutschland
39	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
40	Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Düren, Deutschland
41	Memmert GmbH + CoKG, Schwabach, Deutschland
42	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
43	MP4 Land Camera, Polaroid, Massachusetts, USA
44	MWG Biotech AG, Martinsried, Deutschland
45	Nalgene, Rochester, NY, USA
46	New Brunswick Scientific Co INC, New Jersey, USA
47	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland
48	NUAIRE, Plymouth, MN, USA
49	Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden, Deutschland
50	Olympus Optical Co GmbH, Hamburg, Deutschland
51	Polaroid GmbH, Dreieich-Sprendlingen, Deutschland
52	R&D Systems Inc., Minneapolis MN, USA
53	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
54	Riedel de Haen AG, Seelze, Deutschland
55	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
56	Sanyo, Electric Co Ltd, Japan
57	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
58	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
59	Stratagene, La Jolla, CA, USA
60	Systec GmbH, Wetzlar, Deutschland
61	TPP über Renner GmbH, Dannstadt, Deutschland
62	Ventana Medical Systems, S.A., Illkirch Cedex, Frankreich
63	Wallac, Turku, Finnland
64	WPA, Cambridge, UK

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

Die Durchführung der molekularbiologischen Arbeiten erfolgte, sofern nicht anders vermerkt, nach Angaben aus der Literatur (Ausubel et al., 1987-1999; Sambrook et al., 1989).

### 2.2.1 Präparation genomischer DNA aus humanen Zelllinien

Die genomische DNA aus Zelllinien wurde mit dem DNeasy<sup>®</sup> Tissue Kit (Kapitel 2.1.14) nach Vorschrift des Herstellers extrahiert und in H<sub>2</sub>O oder TE-Puffer gelöst.

### 2.2.2 Fotometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Gehaltsbestimmung von DNA beziehungsweise RNA erfolgte mit dem Fotometer. Nukleinsäuren absorbieren im UV-Bereich bei 260nm und 280nm. Gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz ( $E = \epsilon \times c \times d$ ; wobei  $\epsilon$  eine Stoffkonstante,  $c$  die Konzentration,  $d$  die Schichtdicke der Küvette ist) kann die Absorption zur Konzentrationsbestimmung herangezogen werden. Die Extinktion  $E$  (beziehungsweise  $A$ =Absorption, Absorbance beziehungsweise  $OD$ =optische Dichte) von  $A_{260}=1$  bei Messung in einer 1cm Küvette entspricht 40µg RNA/ml beziehungsweise 50µg DNA/ml. So wurde nach folgender Formel (Sambrook et al., 1989) der Gehalt berechnet:  $x\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNA (doppelsträngig) beziehungsweise RNA (einfachsträngig) =  $y \times 50$  beziehungsweise  $40 \times \text{Verdünnungsfaktor}/1.000$ ; wobei  $y$  der Extinktionswert  $A_{260}$  ist.

Zusätzlich wurde das Verhältnis der Extinktionen bei 260nm und 280nm als Reinheitskriterium der Nukleinsäuren bezüglich der Proteinkontamination herangezogen. Reine Nukleinsäuren sollten theoretisch ein  $A_{260}/A_{280}$ -Verhältnis von 1,8-2,0 aufweisen, das aber auch geringer sein kann, zumal die Messung in H<sub>2</sub>O erfolgte und die  $A_{260}/A_{280}$  vom pH-Wert beeinflusst wird.

Die Proben wurden so mit Wasser verdünnt, dass die Extinktionswerte bei  $A_{260}$  zwischen 0,1 und 1,0 lagen, damit die Linearität der Messwerte gewährleistet war. In Einzelfällen musste wegen geringer RNA-Mengen auf eine Wiederholungsmessung verzichtet werden, so dass auch Werte unter 0,1 als Näherungswerte für den Nukleinsäuregehalt herangezogen wurden.

### **2.2.3 DNA-Sequenzierung**

Zur Sequenzierung wurde die DNA in H<sub>2</sub>O oder Tris-Puffer aufgenommen und nach fotometrischer Gehaltsbestimmung mit spezifischen Primern zum Sequenzierservice, Institut für Humangenetik, Universität Duisburg-Essen beziehungsweise zur Firma QIAGEN gegeben.

### **2.2.4 RNA-Extraktion**

Die RNA-Extraktion aus Kultur- oder Gewebezellen erfolgte mit unterschiedlichen Methoden beziehungsweise Kits verschiedener Hersteller nach deren jeweiligen Angaben. Gemeinsam war den unterschiedlichen Methoden die Lyse der Zellen durch Guanidin-Isothiocyanat-haltigen Puffer. Die weitere Aufarbeitung erfolgte durch Fällungsmethoden nach der Verwendung von Trizol<sup>®</sup> (Chomczynski, 1993) beziehungsweise Fällungsmethoden mit anschließender isopyknischer Zentrifugation (QuickPrep<sup>™</sup> Total RNA Extraction Kit) oder durch die Bindung an Silikamembranen kombiniert mit Zentrifugationsschritten (RNeasy<sup>®</sup> Mini, RNeasy<sup>®</sup> Plus Mini beziehungsweise RNeasy<sup>®</sup> Micro Kit). Bei der letztgenannten Methode erfolgte eine Anreicherung der mRNA, da durch die Silikasäulen kleine RNA-Moleküle mit einer Länge unter 200bp wie 5,8S rRNA, 5S rRNA und tRNA abgetrennt wurden. In der Regel wurden die Zellen aus Zellkulturansätzen direkt im Lysispuffer aufgeschlossen. Bei Gewebeproben wurde das Gewebe mit einem Plastik-Pistill im jeweiligen Lysispuffer zerkleinert und anschließend 10min zentrifugiert, um Gewebebestandteile abzutrennen. Durch 15-maliges Auf- und Abziehen mit Spritze und Nadel wurde das Zelllysate homogenisiert.

### **2.2.5 DNase-Verdau der RNA-Präparate**

Um eine mögliche Verunreinigung der RNA mit DNA zu reduzieren oder zu eliminieren, wurde in einigen Fällen ein Verdau der genomischen DNA vor Durchführung der Reversen Transkription durchgeführt. Der DNase-Verdau erfolgte nach Herstellerangaben entweder mit dem Enzym DNase I in Lösung (INVITROGEN) oder während der RNA-Extraktion auf der Säule mit dem Enzym der Firma QIAGEN. Der DNase-Verdau wurde für die FAM107A-Expressionsanalysen der Zelllinien nicht durchgeführt, was zu Amplifikationsprodukten von genomischer DNA in der FLNB-RT-PCR führte.



## 2.2.6 Reverse Transkription (RT)

Durch die Reverse Transkription wird RNA in amplifizierbare cDNA umgeschrieben und damit u.a. PCR-Analysen zugänglich gemacht. Die Reverse Transkription wurde in der Regel an 1µg Gesamt-RNA mit Oligo-dT(12-18) und dem Enzym Omniscript<sup>®</sup>, mit der M-MLV Reversen Transkriptase oder SuperScript<sup>®</sup> II RT nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden jeweils pro Probe zwei Reaktionen angesetzt, zum einen die in weiterer Arbeit sogenannte „RT(+)“ (vollständiger RT-Ansatz) und die „RT(-)“ (Ansatz ohne Reverse Transkriptase als Negativkontrolle).

## 2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde überwiegend als RT-PCR durchgeführt (Mullis et al., 1992; Mullis and Faloona, 1987; Saiki et al., 1985). Die PCR erlaubt die exponentielle Vervielfältigung von DNA-Stücken einer Länge von bis zu 5kb, unter bestimmten Bedingungen auch bis zu 50kb. In der vorliegenden Arbeit wurde sie als präparative Methode zur Vermehrung von DNA genutzt, aber auch zur Identifikation bestimmter DNA-Abschnitte oder von Genen und als RT-PCR für die Bestimmung derer Expression. Die DNA-Stücke, die hierbei als Ausgangsprobe (im weiteren Verlauf der Arbeit als Template bezeichnet) dienten, waren cDNA, genomische DNA aus Zelllinien, Plasmid-DNA oder DNA von in 20µl LB-Amp-Medium suspendierten Bakterienklonen einer Übernacht-Kultur (Kolonie-PCR). Dabei wurden für die Amplifikation genomischer DNA 100ng eingesetzt, für die RT-PCR 1/10 der cDNA-Synthese, in der Regel 2µl des 20µl RT-Ansatzes sowie für die Überprüfung von Plasmiden 5µl Bakterienkultur aus einer Suspension einer einzelnen Bakterienkolonie in 20µl LB-AMP-Medium (*Tabellen 2.3, S.34, 8.7-8.8, S.151f.*).

### Tab 2.3: Standardprotokoll für die PCR

Für das Standardprotokoll der PCR in der vorliegenden Arbeit wurde für ein Gesamtvolumen von 50µl pro untersuchter Probe eine Reaktionslösung hergestellt, ein sogenannter Mastermix mit folgender Zusammensetzung pro Probe: 20pmol Primer, 1 Enzymeinheit (Enzyme unit; Unit) Taq Polymerase, 10mM Nukleotide in 1XPCR-Puffer mit 1,5mM Magnesiumchlorid. Die Temperatur der Annealingphase und ihre zeitliche Dauer sowie die Zeit der Elongationsphase wurden entsprechend der verwendeten Primer und dem erwarteten Amplifikat angepasst (*Tab 8.8, S.152*).

Schritte der PCR	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1 Initiale Denaturierung	95	5
2 Denaturierung	95	0,5
3 „Annealing“ der Primer	60	0,5
4 Elongation	70	1
5 Wiederholung der Schritte 2-4 in der Regel 34x, oder nach Erfordernissen des erwarteten Amplikons		
6 Terminale Elongation	70	10
7 Kühlung der Endprodukte bis zur weiteren Verarbeitung	8	Nach Bedarf

### 2.2.8 RT-PCR zum Nachweis der Expression von FAM107A-mRNA

Die Expression von FAM107A-mRNA wurde in diversen Zelllinien und Gewebeproben mittels RT-PCR überprüft. Aus Kulturzellen beziehungsweise dem Gewebe wurde die Gesamt-RNA extrahiert (Kapitel 2.2.4, 2.2.5). Nach Umschreiben in cDNA (Kapitel 2.2.6) wurde der Erfolg dieser cDNA-Synthese durch RT-PCR mit dem Kontroll-Primerpaar FLNB-2631+/FLNB-2822- (*Tabellen 2.3, S.34, 8.7-8.8, S.151f.*) überprüft, wobei 10% des cDNA-Ansatzes (2µl=4% des Gesamt-PCR-Volumens) verwendet wurde. Die Expression der FAM107A-ORF-Sequenz wurde im gleichen Reaktionsansatz folgendermaßen geprüft:

Der PCR-Mastermix wurde auf die Hälfte der vorbereiteten Reaktionsgefäße verteilt. Danach wurde die cDNA-Probe hinzugegeben und der Einzelansatz 1:1 geteilt. In die eine Hälfte der Probenansätze wurde das Kontroll-Primerpaar FLNB hinzugegeben, in die andere Hälfte das FAM107A-Primerpaar FAM107A-458+/FAM107A-897- (*Tabellen 2.3, S.34, 8.7-8.8, S.151f.*), damit Test- und Kontroll-RT-PCR unter den gleichen Bedingungen ablaufen konnten. Grundsätzlich wurde die RT-PCR sowohl an den RT(+)- als auch den RT(-)-Proben, die in den Legenden bei den Abbildungen zusammengefasst als „+/-RT“ bezeichnet wurden, durchgeführt.

Zur Analyse der Expression von FAM107A-mRNA wurde ein FAM107A-ORF amplifizierendes Primerpaar gewählt, das 2 Introns umspannt. Auf genomischer Ebene ergäbe sich ein Amplikon von 3.288bp, das bei den gewählten PCR-Bedingungen nicht gebildet wurde. Auf der cDNA-Ebene ergibt sich ein Amplikon von 450bp, das nicht zwischen den beiden Transkriptvarianten unterscheiden kann. Da die Primer sich nicht an Exon/Intron-Grenzen anlagern, wurden bei jeder RT-PCR die RT-Kontrollen mitgeführt. Als Positivkontrolle für die FAM107A-RT-PCR wurde das nicht linearisierte Plasmid pCDNA3.1ZEO(+)-FAM107-ORF verwendet (Positiv-Template-FAM107A). Das Primer-Paar, das zur Analyse der Expression von FLNB-mRNA verwendet wurde, ist auch Intron-umspannend. Die erwarteten Amplifikate haben eine Größe von 192bp (cDNA) und 459bp (genomische DNA). Dies ermöglichte die Verwendung von genomischer DNA als Positiv-Template. Entweder wurde Plazenta-DNA (Positiv-Template-FLNB-1) oder genomische DNA aus ARPE-19-Zellen (Positiv-Template-FLNB-2) verwendet. Ausgewertet wurden nur RT-PCR-Analysen, die eine Expression von FLNB zeigten. Auf eine Erläuterung dieser Ergebnisse der FLNB-RT-PCR wurde in der weiteren Arbeit verzichtet, es sei denn,

es fanden sich schwach oder nicht messbare Expressionen. In der Regel wurden nur die Versuche verwendet, in denen die FLNB-cDNA amplifiziert wurde. Die RT-PCR-Analyse wurde dreimal durchgeführt, Abweichungen von diesem Standard werden bei den Ergebnissen (Kapitel 3.2) erwähnt. Die Ergebnisse der FAM107A-Expressionsanalyse wurden auch hinsichtlich ihrer Korrelation zur Lokalisation der untersuchten Zell- beziehungsweise Gewebeproben (C-Codierung) und zu der Angabe des ICD-O-3-Code untersucht.

### **2.2.9 Gelelektrophorese**

Mit der Gelelektrophorese werden Nukleinsäuren durch Wanderung im elektrischen Spannungsfeld entsprechend ihrer Ladung, molekularen Größe und Konformation aufgetrennt (Ausubel et al., 1987-1999; Sambrook et al., 1989). In der vorliegenden Arbeit diente sie der Analyse von Produkten der PCR, der präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Restriktionsverdau und dem Nachweis der Integrität von DNA. Zur Überprüfung der Qualität der RNA wurden ebenfalls nicht denaturierende 1%ige Agarosegele verwendet.

Die Gelelektrophorese wurde mit Agarosegelen in 1XTAE durchgeführt, wobei die Agarosekonzentration entsprechend der Größe der erwarteten Fragmentgröße gewählt wurde. Wenn nicht in den Legenden unter den Abbildungen anders angegeben, erfolgte die Auftrennung in 1,5%igen Agarosegelen bei 100Volt für 60min. Den Gelen wurde beim Gießen DNA-interkalierendes Ethidiumbromid (0,001µg/ 100ml) hinzugefügt, so dass die Auswertung durch Illumination unter UV-Licht erfolgen konnte. Die Gele wurden durch Fotografie dokumentiert unter Verwendung eines Gelb/Orangefilters (37, *Tab 2.2*, S.31), in der Regel bei Blende 4,5 und einer Belichtungszeit von einer Sekunde.

### **2.2.10 Aufreinigung von PCR-Produkten und DNA-Banden aus Agarosegelen**

Die Aufreinigung der PCR-Produkte zur Sequenzierung erfolgte mit dem QIAquick® PCR Purification Kit beziehungsweise GFX® PCR DNA and Gel Band Purification Kit nach Angaben des Herstellers. PCR-Produkte wurden extrahiert, DNA-Banden aus Agarosegelen ausgeschnitten, gewogen und nach entsprechender Vorschrift extrahiert.

### **2.2.11 Restriktionsverdau und Ligation**

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgt sequenzspezifisch und in einem vom verwendeten Enzym abhängigen Puffer. Für den Restriktionsverdau wurden 0,2-1µg DNA eingesetzt und mit 10U/µl der entsprechenden Restriktionsendonuklease im passenden Puffer nach Vorschrift des Herstellers in der Regel für 60min bei 37°C verdaut. Die Produkte des Restriktionsverdaus wurden mittels Gelelektrophorese überprüft. Ligierte wurde in einem molaren Vektor-Insert-Verhältnis von 1:2 mit 1µl T4-DNA-Ligase in einem Ansatz von 20µl bei Raumtemperatur für 4h nach Vorschrift des Herstellers. Anschließend wurden die Ligationsansätze in Bakterien transformiert (Kapitel 2.2.12).

### **2.2.12 Transformation kompetenter Bakterienzellen**

Bei der Transformation von Bakterien wird Plasmid-DNA durch geeignete Behandlung der Bakterien von diesen aufgenommen und kann so von diesen vermehrt werden. Für die Präparation von Plasmid-DNA wurden 50µl beziehungsweise bei Bedarf auch weniger Subcloning Efficiency<sup>®</sup> DH5α Competent Zellen mit max. 100ng DNA vermischt. Nach einer Inkubation von 30min auf Eis erfolgte ein Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C für 30sec. Die Bakterien wurden auf Eis gekühlt. Nach Hinzufügen von 250µl SOC-Medium wurden die Bakterienzellen für 1h bei 37°C mit 225U/min im Schüttler inkubiert. Zwanzig beziehungsweise 50µl der Bakteriensuspension wurden auf vorgewärmte Agarplatten, die bei Verwendung der pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO-Vektoren mit 0,5mM IPTG und 25µl X-Gal (40mg/ml) versetzt worden waren, ausplattiert und bei 37°C über Nacht bis zu 16h inkubiert.

### **2.2.13 Übernachtskulturen und Glycerinkulturen**

Zur Vermehrung der transformierten Bakterienzellen wurden mit der 20µl-Spitze einer Gilson-Pipette (GILSON) einzelne Klone aufgenommen entweder für eine Kolonie-PCR oder für eine Übernachtskultur in 2ml LB-Amp-Medium. Diese wurde mit 225U/min im Schüttler über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Daueraufbewahrung wurden nach Überprüfung durch eine Mini-Präparation (Kapitel 2.2.14) 100µl Bakteriensuspension in 100ml LB-Amp-Medium bei 225U/min und 37°C im Schüttler über Nacht für 12-16h inkubiert. 600µl von der Bakterienkultur wurden mit 1ml autoklaviertem Glycerin versetzt, gemischt und bei -70°C eingefroren.

## **2.2.14 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien**

### **2.2.14.1 „Mini“-Präparation („MiniPrep“)**

Die „Mini“-Präparation erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse der bakteriellen Zellen (Birnboim and Doly, 1979) mit den Lösungen des Nucleobond® EF Mini Kits. Die Bakterienkultur wurde mit 10.000U/min 20min bei RT zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellsediment in 300µl auf 37°C erwärmtem, RNase-haltigen S1-EF-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 300µl S2-EF (RT) wurde die Bakteriensuspension vorsichtig geschüttelt und auf Eis gestellt. Unter den alkalischen Bedingungen werden sowohl chromosomale als auch Plasmid-DNA denaturiert. Nach Zugabe von 300µl 4°C kaltem S3-EF wurde vorsichtig geschüttelt. Durch diesen Kaliumazetat-haltigen Puffer bildet die chromosomale DNA mit weiteren zellulären Komponenten ein Präzipitat, das mit 14.000U/min bei 4°C für 10min durch Zentrifugieren abgetrennt wurde. Im Überstand, der in ein frisches Eppendorfgefäß gegeben wurde, kann die Plasmid-DNA wieder zu ihrer nativen „supercoiled“ Struktur revertieren. Nach Zugabe von 1ml 100%igem Isopropanol erfolgte eine 30minütige Inkubation bei 4°C, um die Plasmid-DNA zu fällen. Nach einer Zentrifugation bei 14.000U/min und 4°C für 30min wurde der Überstand abgesaugt und die DNA mit 1ml 70%igem Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 14.000U/min und 4°C für 20min wurde der Überstand abgesaugt und die DNA unter dem Abzug getrocknet. Je nach Größe des DNA-Pellets wurde die DNA in bis zu 50µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Aliquots der Plasmid-DNA wurden mit einem analytischen Restriktionsverdau überprüft.

### **2.2.14.2 „Maxi“-Präparation („MaxiPrep“)**

Die „Maxi“-Präparation wurde nach Anweisungen des Herstellers mit dem Endofree Plasmid Maxi Kit oder mit dem Nucleobond® EF Maxi ausgehend von 100ml Bakteriensuspension einer Übernacht-Kultur durchgeführt.

## **2.2.15 Konstruktion der Vektoren, die FAM107A-cDNA enthalten**

Im Allgemeinen erfolgte die Herstellung der Vektoren jeweils in zwei Schritten (*Abb 7*). Das jeweilige Insert wurde mit dem TOPO TA Cloning® Kit nach Vorschrift des Herstellers in den pCR®2.1-Vektor zwischenkloniert. Nach Vermehrung in E.coli-Zellen wurden die entsprechenden Inserts in den Zielvektor pcDNA3.1Zeo(+) beziehungsweise pcDNA3.1Zeo(+)-IRES-EGFP umkloniert. Dafür wurde der Expressionsvektor und der entsprechende intermediäre pCR®2.1-Topo-Vektor nach

Plasmidextraktion mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geschnitten, die Restriktionsprodukte mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, extrahiert und die Inserts mit dem Plasmid ligiert. Zur Herstellung des Vektors pcDNA3.1Zeo(+)-FAM107A-1,1 (FAM107A-1,1-Vektor) wurde mittels RT-PCR ausgehend von Nieren-cDNA ein 1,1kb-Fragment des 5'-Endes der FAM107A-cDNA amplifiziert (Primer: FAM107A-1+/FAM107A-1.011-, *Tabellen 2.3*, S.34, 8.7-8.8, S.151f.). Das Amplifikat wurde in den pCR<sup>®</sup>2.1-Vektor zwischenkloniert und die Identität des Inserts durch Sequenzierung verifiziert. Anschließend wurde das Fragment nach *Eco*R1-Verdau in den Zielvektor pcDNA3.1Zeo(+) kloniert. Zur Herstellung des Vektors mit der FAM107A-Volllänge-cDNA wurde zum einen für das 5'-Ende der FAM107A-cDNA der konstruierte FAM107A-1,1-Vektor verwendet. Zum anderen wurde für das 3'-Ende der FAM107A-cDNA mittels RT-PCR ein 2,4kb-Fragment aus oligo-dT-geprimter Nieren-cDNA amplifiziert (Primer: FAM107A-936+/FAM107A-3364-, *Tabellen 2.3*, S.34, 8.7-8.8, S.151f.) und in den intermediären pCR<sup>®</sup>2.1-Topo-Vektor kloniert. Nach Restriktionsverdau mit dem Enzym AatII des intermediären Vektors und des FAM107A-1,1-Vektors wurde das 2,4kb-FAM107A-AatII-Fragment in den FAM107A-1,1-Vektor kloniert.

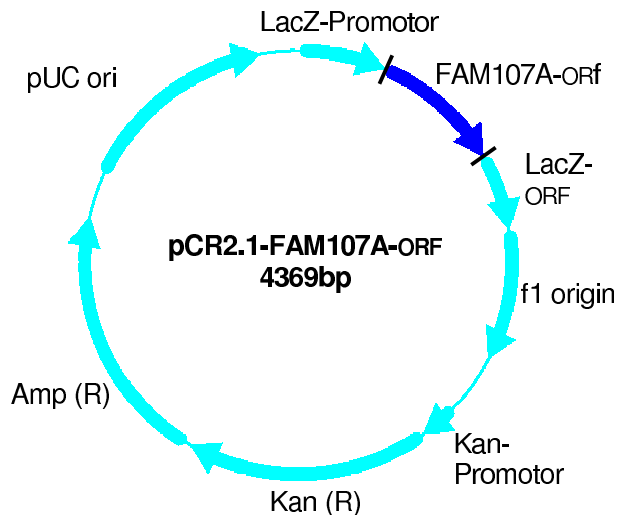
Zusätzlich wurden Expressionsvektoren mit dem EGFP-Fluoreszenzgen konstruiert, um in späteren Versuchen die EGFP-exprimierenden Zellen durchflusszytometrisch selektieren zu können. Dafür wurde jeweils die FAM107A-ORF- beziehungsweise die FAM107A-1,1-Sequenz aus den vorher beschriebenen Vektoren nach *Eco*R1-Verdau in den Vektor pCDNA3.1ZEO(+)-IRES-EGFP kloniert.

**Tab 2.4: Regulatorische Sequenzen der verwendeten Vektoren**

Merkmal	Eigenschaften
Amp (R)	Ampicillin-Resistenzgen
Amp (R)-Promotor	Ermöglicht die Expression von Amp (R) in <i>E.coli</i> .
BGHpA	Bovine growth hormone polyadenylation signal: ermöglicht das Transkriptionsende und die Polyadenylierung von mRNA.
CMV-Promotor	Humaner Zytomegalievirus-Promotor und -Enhancer: ermöglicht hohe Expression vom rekombinanten Protein (Andersson et al., 1989).
EM7-Promotor	Ermöglicht die Expression von Zeo (R) in <i>E.coli</i> .
f1 origin	Replikationsorigin des Phagen f1 zur Expression einzelsträngiger DNA.
Kan (R)	Kanamycin Resistenzgen
Kan-Promotor	Kanamycin Promotor
pUC ori	pUC origin: ermöglicht Replikation und Wachstum in <i>E.coli</i> .
SV40 early Promotor/Enhancer/ori	Promotor und origin, erlaubt effiziente und hohe Expression von Zeo (R) in Zellen, die SV40 large T-Antigen exprimieren (Andersson et al., 1989).
SV40pA	SV40 Polyadenylierungssignal: ermöglicht Transkriptionsende von mRNA und Polyadenylierung.
Zeo (R)	Zeocin-Resistenzgen

5' → 3'  
**FAM107A-ORF 440bp,**  
 mit Primern FAM107A-458+ und FAM107A-897-

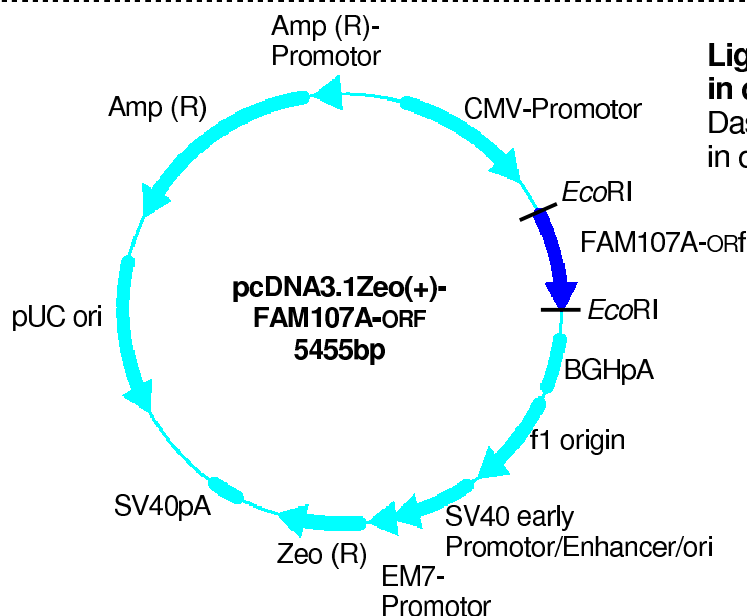
**Amplifikation des Inserts mittels PCR am FAM107A-1,1-Vektor**  
 Isolierung des Fragmentes mit präparativer Gelelektrophorese



**Einklonieren des PCR-Produkts in den Vektor pCR2.1-TOPO**  
 FAM107A-ORF wurde in die Topo-Bindungsstelle zwischen der *EcoRI*-Schnittstelle der Multiple Cloning Site (MCS) ligiert. Diese liegt zwischen LacZ-Promotor und LacZ-ORF, so dass durch das Insert das LacZ-Gen funktionell inaktiviert wurde.

*EcoRI* → *EcoRI*  
**FAM107A-ORF 440bp**

**Restriktionsverdau des Vektors pCR2.1-FAM107A-ORF mit *EcoRI***  
 Isolierung des Fragmentes mit präparativer Gelelektrophorese



**Ligation des Inserts FAM107A-ORF in den Zielvektor pcDNA3.1Zeo(+)**  
 Das FAM107A-ORF-Fragment wurde in die *EcoRI*-Schnittstellen ligiert.

**Abb 7: Klonierungsstrategie am Beispiel des FAM107A-ORF-Vektors.** Herstellung des Zielvektors pcDNA3.1Zeo(+)-FAM107A-ORF durch Umklonierung des Inserts FAM107A-ORF aus dem Zwischenvektor pCR2.1-FAM107A-ORF. Im Bereich des Vektors befinden sich regulatorische Sequenzen (Tab 2.4, S.39).

## **2.3 Allgemeine Methoden der Zellkultur**

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Zelllinien bei einer Temperatur von 37 °C und einer CO<sub>2</sub>-Begasung von 5% in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert. Die Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank der Klasse II durchgeführt. Die Gebrauchsmaterialien wurden vor Gebrauch bei 180 °C im Trockensterilisator (Glaspipetten) oder durch Autoklavieren (Polypropylenmaterialien) sterilisiert. Sämtliche Lösungen wurden entweder als sterile Lösungen vom Hersteller (*Tab 2.2*, S.31) bezogen oder durch Autoklavieren beziehungsweise Sterilfiltration durch Filter der Porengröße 0,2 µm vor der Anwendung sterilisiert.

### **2.3.1 Passagieren/Expandieren von Zellen**

Die Zelllinien wurden in DMEM mit Zusatz von 10% FCS, 1% L-Glutamin, entspricht einer Endkonzentration von 2mM, und 1% Penicillin/Streptomycin, entspricht einer Endkonzentration von 100U/ml Penicillin beziehungsweise 100 µg/ml Streptomycin (in der weiteren Arbeit als „Vollmedium“ bezeichnet), kultiviert. Eine Ausnahme bildeten die primären RPE-Zellen, die im IMDM-Medium kultiviert wurden. Zum Passagieren mussten die adhärennten Zellen zuerst durch das proteolytische Enzym Trypsin von der Wachstumsoberfläche abgelöst werden. Zuvor wurden sie nach Absaugen des Mediums mit 2-5ml PBS, je nach Größe der Wachstumsoberfläche, gewaschen. Anschließend wurde je nach Zellkulturflaschengröße 1ml (für T75-Flasche) beziehungsweise 0,5ml (für T25-Flasche) Trypsin/EDTA zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 3-5min bei RT wurden die Zellen durch leichtes Aufklopfen der Flasche auf der Werkbank von der Oberfläche gelöst. Das Ablösen und die Desaggregation wurden mikroskopisch überprüft. Weitere Trypsinwirkung wurde durch Zugabe von 9ml (bei T75-Flasche) beziehungsweise 4,5ml (bei T25-Flasche) Vollmedium inaktiviert. Entsprechend der benötigten Zellzahl und/oder der erwarteten Proliferation wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:20 passagiert. Dazu wurde die entsprechende Menge an Zellsuspension in das vorgelegte Medium gegeben.

### **2.3.2 Kryokonservieren von Zellen**

Theoretisch können Zellen in spezifischen Einfriermedien in flüssigem Stickstoff über Jahre gelagert werden. Dafür wurden die Zelllinien bei einer Zelldichte von 50-80%



Konfluenz trypsinisiert. Nach 5min Zentrifugation bei 1.200U/min wurde das Zellpellet mit 5ml PBS gewaschen und 5min bei 1.200U/min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zunächst in 2ml Medium (50% DMEM ohne Zusatz/ 50% FCS) resuspendiert. Nach Zugabe von 2ml Einfriermedium (40% DMEM ohne Zusatz/ 40% FCS/ 20% DMSO) wurde die Zellsuspension durch Auf- und Abpipettieren vorsichtig in dem gesamten Volumen von 4ml resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde auf 3 Kryoröhrchen verteilt und unmittelbar in eine Nalgene®-Kryobox gestellt. Diese wurde bei -70 °C eingefroren. Nach einem Tag wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt und dort gelagert. Die eingefrorene Zellsuspension wurde bei Bedarf im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und sofort in 5ml FCS resuspendiert. Nach einer 5minütigen Zentrifugation bei 1.200U/min wurden die Zellen in 3ml Vollmedium resuspendiert und in eine T25-Flasche überführt, in der 2ml Medium vorgelegt wurden.

### 2.3.3 Test auf Mykoplasmenkontamination

Zellkulturen können mit Mykoplasmen (Tax-ID 2093), zellwandlosen, polymorphen Bakterien, kontaminiert sein. Deshalb wurden alle 3 - 5 Monate die in Kultur gehaltenen Zelllinien auf das Vorkommen von Mykoplasmen untersucht. Dazu wurde eine Färbung mit DAPI durchgeführt.  $1 \times 10^4$  Zellen wurden ausgesät und nach 24h mit PBS gewaschen, 15min mit DAPI (6µg/µl) inkubiert und nach nochmaligem Waschen mit PBS im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Es wurde nur mit mykoplasmenfreien Zelllinien gearbeitet.

### 2.3.4 Bestimmen der Zellzahl

Nach dem Trypsinieren wurden die Zellen 5min bei 1.200U/min zentrifugiert. Nach Resuspendieren in 1ml PBS beziehungsweise in 1ml Medium wurden 10µl der Zellsuspension mit 10µl Trypanblau versetzt (1:1) beziehungsweise bei größerer Zellzahl mit zusätzlichem PBS verdünnt. Davon wurden 10µl in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Aus den nicht blau angefärbten, vitalen Zellen pro großem Quadrat ließ sich die Zellzahl als „Anzahl von Zellen/ml“ mit folgender Formel bestimmen:

$$N_G = N_D \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \times V$$

$$N_G = \text{Gesamtzellzahl}$$

$$N_D = \text{Durchschnittliche Anzahl Zellen pro großer Kammer}$$

$$V = \text{Volumen [ml], in dem die Zellen aufgenommen worden sind}$$

Für weitere Analysen wie RNA-Extraktion und DNA-Extraktion wurden die Zellen bei 10.000U/min 5min in der Tischzentrifuge sedimentiert und nach Abnahme des PBS bei -70 °C eingefroren.

### 2.3.5 Etablierung FAM107A ektopisch stabil exprimierender Zelllinien

Die Expressionsvektoren FAM107A-ORF-Vektor, FAM107A-1,1-Vektor und der Leervektor pCDNA3.1ZEO(+) (Leervektor) wurden in die Nierenkarzinomzelllinien RCC-1 und HTB-46 stabil transfiziert. Dafür wurden pro Zelllinie drei Versuche angesetzt: ein Kontrollansatz nur mit dem Transfektionsagens, ein Kontrollansatz mit dem Leervektor und ein Ansatz mit dem FAM107A-ORF-Vektor.

Für die Transfektion wurden je  $10^5$ ,  $10^4$  beziehungsweise  $10^3$  Zellen pro 10cm Zellkulturschale in 10ml Vollmedium im Triplikat ausgesät. Nach 24h wurden pro Ansatz je 5µg Plasmid-DNA auf 1ml DMEM (Lösung A) sowie 30µl Lipofectamine® auf 1ml DMEM (Lösung B) versetzt. Nach Mischen der beiden Lösungen erfolgte eine Inkubation bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>. Nach 30min wurde der Transfektionskomplex auf die Zellen getropft, die zuvor mit PBS gewaschen worden waren und mit je 3ml DMEM (ohne Zusatz) versetzt worden waren. Nach 6h erfolgte ein Mediumwechsel mit 10ml Vollmedium unter Zusatz von 0,5mg/ml Zeocin. Für zwei bis drei Wochen wurde zweimal pro Woche das Medium gewechselt. Die gewachsenen Kolonien wurden mittels Ringklonierung selektiert: Auf der Unterseite der Zellkulturschale wurden sie mit einem Stift gekennzeichnet. Mit Hilfe eines Metallrings wurden einzelne Kolonien trypsinisiert und 12 Kolonien weiter expandiert. Aus den Zellen der stabil transfizierten Zelllinien (Passage 2) wurde genomische DNA extrahiert. Mittels PCR wurde mit den Primern Chr3-58.035.418-/Chr3-58.035.874+ (*Tabellen 2.3, S.34, 8.7-8.8, S.151f.*) zur Kontrolle der DNA ein Sequenzbereich von 484bp amplifiziert. Mittels einer weiteren PCR mit den Primern Chr3-58.505.732-/Chr3-58.503.509+ (*Tabellen 2.3, S.34, 8.7-8.8, S.151f.*) wurde zur weiteren Kontrolle ein größerer Bereich von über 2kb in ausgewählten Zelllinien amplifiziert.

### 2.3.6 Fixieren und Permeabilisieren von Zellen für durchflusszytometrische Analysen

Zur Fixierung für die durchflusszytometrische Analyse beziehungsweise weitere Permeabilisierung wurden die Zellen nach dem Trypsinieren und Waschen mit PBS in 500-1.000µl 3,7%igem Formaldehyd in PBS für 20min bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen 5min bei 1.200U/min zentrifugiert, mit 500-1.000µl PBS

gewaschen, in 300-1.000µl PBS aufgenommen und bei 4°C gelagert beziehungsweise der weiteren Analyse zugeführt.

Nach der Fixierung wurden die Zellen zur Permeabilisierung für die Zellzyklusanalyse in 500µl PBS aufgenommen und mit 5ml eiskaltem 70%igem Ethanol tropfenweise versetzt. Inkubiert wurde bei 8°C für 10min oder über Nacht. Für die Färbung mit dem Survivinantikörper wurden die Zellen mit 0,5% Saponin/3% BSA in PBS 5min auf Eis inkubiert und anschließend 15min in 0,1% Saponin/3% BSA in PBS geblockt.

### **2.3.7 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie wurde zur Zellzyklusanalyse, zum Nachweis von HLA-Oberflächenantigenen und von Survivin eingesetzt. Sie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage von Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften.

Die Zellen treten in einem Flüssigkeitsstrom als Einzelzellsuspension durch einen Argon-Laserstrahl, der dadurch gestreut wird. Dabei werden die physikalischen Parameter Zellgröße und Granularität detektiert, gemessen und analysiert. Außerdem werden die in/auf den Zellen vorhandenen Fluorochrome (wie z.B. Fluorescein) angeregt, was zur Emission von Fluoreszenz charakteristischer Wellenlänge führt. Diese Fluoreszenz wird in ein elektrisches Signal umgewandelt und dokumentiert.

Zur Analyse wurden die Zellen in mindestens 300-500µl PBS aufgenommen und der durchflusszytometrischen Messung im Durchflusszytometer EPICS XL, BECKMANN COULTER, zugeführt. Eine Messung umfasste 10.000-30.000 detektierte Ereignisse. EGFP und FITC-markierte Antikörper wurden im Kanal FL1 (Fluorescent Channel 1, ca. 525nm), PC5-konjugierte Antikörper und Propidiumjodid-gefärbte Zellen im Kanal FL3 (Fluorescent Channel 3, ca. 590nm) gemessen. Zur Auswertung wurden die erhaltenen Daten mit der Software „WinMDI“ Version 2.8, Build 1301-19-2000 (Windows Multiple Document Interface, Flow Cytometry Application, Copyright 1993-1998 Joseph Trotter, Scripps Institute, La Jolla, CA, USA) dargestellt. Als weitere Hilfe zur Darstellung wurde die Reanalysierungssoftware „EXPO32 ADC Analysis“ (BECKMANN COULTER; 1993, 2000 Applied Cytometry Systems) genutzt.

## 2.4 Genomische Analysen von Zelllinien

### 2.4.1 Karyotypisierung

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 80-90% zur Metaphasengewinnung in das Chromosomenlabor (Innere Klinik (Tumorforschung), Universitätsklinikum Essen) gegeben. Die Zellen wurden mit 10µl Colcemid pro ml Medium für mindestens 1h inkubiert, bis die Zellen sich lösten. Der Überstand wurde abgenommen und für 10min bei 1.300U/min zentrifugiert. Das Zellpellet und die restlichen in der Zellkulturschale verbliebenen Zellen wurden je mit vorgewärmten 0,075M KCl für 20min inkubiert. Nach Zentrifugieren der Zellen wurden sie tropfenweise mit 8-10ml Carnoys Fixativ (Methanol/Essigsäure; 3:1) fixiert und zentrifugiert. Nach wiederholtem Fixieren wurden die Zellen im Fixativ bei 4-8°C für mindestens 24h gekühlt. Die Präparate wurden erstellt, indem aus ca. 30cm Höhe ein Tropfen auf die Objektträger fallen gelassen wurde. Getrocknet wurden die Metaphasen bei 80°C für 2-4h, bis die G/R-Banden sichtbar wurden. Nach Ablösen durch Trypsinlösung/Hanks Salzlösung (1:1) wurden die Zellen mit Giemsa gefärbt. Die Zellen wurden mit einer Nikon CCD (charge-coupled device) Kamera fotografiert und mit einem „Genevision 221“-Karyotypisierungssystem (APPLIED SPECTRAL IMAGING, *Tab 2.2*, S.31) ausgewertet. Die klonalen Aberrationen, d.h. strukturelle Veränderungen, die in mindestens zwei Zellen vorkamen und Verluste, die in mindestens drei Zellen auftraten (Mitelmann, 1995), wurden ausgezählt (*Tab 8.11*, S. 154f.).

### 2.4.2 PCR-Analyse genomischer DNA

Von den untersuchten Zelllinien, die auf Expression von FAM107A mit RT-PCR untersucht wurden, wurden stichprobenweise zehn Linien (RCC-1, HTB-45, HTB-46, SN12c, MCF7, HBL-100, H23, HeLa, BLM und ARPE-19) auf genomischer Ebene mittels PCR daraufhin analysiert, ob eine fehlende Expression von FAM107A auf einer homozygoten Deletion beruhte.

Nach Extraktion genomischer DNA (Kapitel 2.2.1) aus einem Zellkulturpellet (Kapitel 2.3.4) wurde die Qualität der DNA mit Gelelektrophorese kontrolliert. Die PCR wurde zweimal durchgeführt, wobei teils Zellen unterschiedlicher Zellkulturpassagen untersucht wurden. Mit dem Kontroll-Primerpaar FLNB-2631+/FLNB-2822- wurde

geprüft, ob sich die DNA in der PCR amplifizieren ließ (*Tabellen 2.3, S.34, 8.7-8.8, S.151f.*). FAM107A wurde durch PCR mit dem Primerpaar FAM107A-696+/FAM107A-850- (*Tabellen 2.3, S.34, 8.7-8.8, S.151f.*) im Genom als ein Amplifikat mit einer Größe von 667bp (bezeichnet als FAM107-667bp-Amplifikat) nachgewiesen.

## **2.5. Überprüfung der Expression von FAM107A-mRNA in Abhängigkeit von unterschiedlichen Einflussgrößen**

### **2.5.1 Expression von FAM107A in Abhängigkeit vom zirkadianen Rhythmus**

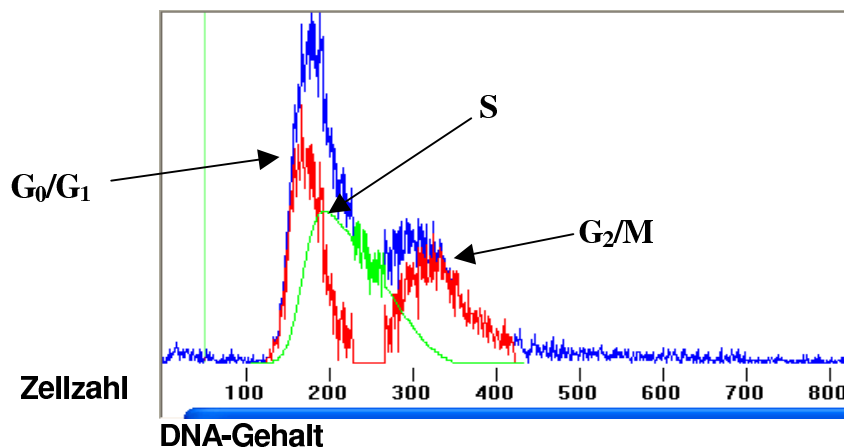
Um einen eventuellen Einfluss des Zellzyklus' auf die zirkadiane Rhythmik auszuschließen, wurden die Zellen mit einem Doppel-Thymidinblock behandelt (Whitfield et al., 2002). Durch einen Überschuss an Thymidin werden dabei Zellen in der G<sub>1</sub>/S-Phase blockiert (Bostock, 1971). Hierdurch sollte RNA einer weitgehend synchronisierten Zellpopulation gewonnen werden. Zusätzlich wurden als Kontrolle die Zelllinien auch unbehandelt kultiviert.

Es wurden  $1 \times 10^5$  Zellen (ARPE-19, HeLa, RCC-1 und SN12c) in einer T-25-Flasche ausgesät, so dass sie nach 24h Inkubation bei 37°C zu ca. 10-20% konfluent waren. Die Zellen wurden 2X mit PBS gewaschen und für 18h mit 2mM Thymidin in Vollmedium inkubiert. Nach Entfernung des Thymidin-haltigen Mediums wurden die adhärennten Zellen einmal mit PBS gewaschen und für 9h mit Vollmedium versetzt. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen nochmals 17h mit 2mM Thymidin in Vollmedium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wieder mit PBS gewaschen und über einen Zeitraum von 48h in einem Zeitabstand von jeweils 6h fotografisch dokumentiert, pelletiert, gezählt und bis zur RNA-Extraktion eingefroren (Kapitel 2.2.4). Der Zustand des Synchronisationsgrads der Kulturen wurde durch durchflusszytometrische Zellzyklus-Analyse eines Aliquots des Zellpellets überprüft (Kapitel 2.5.2).

### **2.5.2 Expression von FAM107A in Abhängigkeit vom Zellzyklus**

Die Analyse des Zellzyklus' erfolgte durch Färben der nukleären DNA mit Propidiumjodid und anschließender durchflusszytometrischer Analyse. Der DNA-Gehalt der Zellen verdoppelt sich während eines Zellzyklus', so dass je nach DNA-Gehalt eine Zuordnung der Zellen zu einer bestimmten Zellzyklusphase möglich ist.

Es wurden  $0,7 \times 10^5$  RCC-1-Zellen beziehungsweise  $1,5 \times 10^5$  HTB-46-Zellen ausgesät. Nach 24h wurde ein Aliquot der Zellen pelletiert und bis zur RNA-Extraktion eingefroren (Kapitel 2.2.4). Die anderen Zellen wurden fixiert und zur Aufnahme des Propidiumjodid permeabilisiert (Kapitel 2.3.6). Ebenfalls wurde ein Aliquot der Zellen aus der Analyse der zirkadianen Rhythmik untersucht. Die Zellen wurden in 300-500µl PI-Färbelösung resuspendiert und nach 30min Inkubation bei RT durchflusszytometrisch analysiert (Kapitel 2.3.7). Die erhaltenen Daten von je 15.000 Zellen wurden nach Histogrammerstellung mit „WinMDI“ Version 2.8 mit dem Programm „Cylchred“ (Cardiff, England, Version 1.0.2 für Windows 95) ausgewertet (Ormerod et al., 1987; Watson et al., 1987) und als Prozentsatz positiver Zellen in der  $G_0/G_1$ -, S- und  $G_2/M$ -Phase angegeben (Abb 8).



**Abb 8: Beispielhafte Darstellung der Cylchredauswertung der HTB-46-Zellen.** Die blaue Kurve ist die Darstellung des originalen Histogramms. Die rote beziehungsweise grüne Kurve zeigt die von der Software automatisch errechnete AUC (Area under the curve) für den Anteil von Zellen in der  $G_0/G_1$ -, S- bzw.  $G_2$ -Phase. Als Zahlwerte werden Prozentwerte angegeben. Jede AUC-Teilfläche wird zur Gesamt-AUC ( $G_0/G_1$ , S und  $G_2/M$ ) ins Verhältnis gesetzt. Die grüne vertikale Linie setzt die Grenze für die Debris-Werte. Der DNA-Gehalt wird gemessen durch die Fluoreszenz, gemessen im FL3 in den Fluoreszenzkanälen 0-1023, dargestellt bis ca. 800.

### 2.5.3 Bestimmung des Einflusses der Konfluenz auf die Expression von FAM107A

Die Zelldichte, zu der die Zellen in der Zellkulturflasche zusammenwachsen, kann die Expression von Genen beeinflussen (Cooper, 2000). Um die Auswirkung der Konfluenz auf die Expression von FAM107A zu untersuchen, wurden je  $1 \times 10^5$  Zellen (ARPE-19, HeLa und SN12c) in zwei Zellkulturschalen unterschiedlicher Wachstumsflächengröße ausgesät: Sechs-Loch-Zellkultur-Testplatte ( $9,03 \text{ cm}^2$ ) und 10cm-Platte ( $60,1 \text{ cm}^2$  Wachstumsflächengröße). Nach vier Tagen wurden die subkonfluenten (ca. 30-40% Konfluenz) und konfluenten (ca. 90-100% Konfluenz) Zellen geerntet und, nach Waschen mit PBS, bei  $-70^\circ\text{C}$  zur RNA-Extraktion mit anschließender RT-PCR (Kapitel 2.2.4-8) eingefroren.

## 2.5.4 Einfluss von erhöhter Temperatur („Hitzeschock“) auf die Expression von FAM107A

Um zu überprüfen, ob die FAM107A-Expression durch Hitzeschock induzierbar ist, wurde ein Hitzetest durchgeführt.

Für den Hitzetest wurden  $2,7 \times 10^5$  Zellen (ARPE-19, HeLa und SN12c) ausgesät. Nach 24h wurden die Zellen für 60min in einem 43°C warmen Wasserbad inkubiert. Vor der Inkubation wurde das Medium auf 50ml aufgefüllt, so dass die Zellkulturflasche vertikal eingetaucht und fixiert werden konnte und die Zellen in der Zellkulturflasche vom warmen Wasser umgeben waren. Die Menge des Mediums garantierte die Stabilität des pH-Wertes über den Zeitraum von einer Stunde, wie an der Farbe des pH-Indikators im Medium ersichtlich wurde. Als Kontrolle dienten Zellen, die während der Hitzebehandlung der anderen Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> blieben. Nach einer Erholungsphase von 30min im Brutschrank (Kretz-Remy et al., 2001) wurden die Zellen pelletiert, gezählt und nach Waschen mit PBS bei -70°C bis zur RNA-Extraktion (Kapitel 2.2.4-8) eingefroren.

## 2.6 Untersuchungen zur epigenetischen Beeinflussung der Expression von FAM107A-mRNA

### 2.6.1 Behandlung von Zelllinien mit Decitabin

Die Neumethylierung während der Replikation der DNA kann durch Decitabin, ein Cytidinanalogon, gehemmt werden. Decitabin wird bei der DNA-Synthese in die DNA eingebaut und fängt durch kovalente Bindung die DNA-Methyltransferasen ab. Anschließende Expressionsanalysen geben dann einen ersten Aufschluss über mögliche Methylierungen, die die Expression des Genprodukts von Interesse beeinflussen können.

Die Zelllinien wurden drei bis fünf Tage mit 1-5µM Decitabin behandelt (*Tab 8.9, S.153*). Der Zeitraum der Behandlung umfasste mindestens drei Tage, so dass gewährleistet war, dass die Generationszeit der Zelllinien erfasst wurde. Diese wurde den Datenbanken wie z.B. der von ATCC entnommen oder rechnerisch mit folgender Formel ermittelt: Generationszeit (Populationsverdopplungszeit,  $t_g$ ):

$$t_g = \log 2 \cdot \Delta t / (\log N - \log N_0)$$

wobei gilt:  $\Delta t = t - t_0$ ,  $N_0$  = Zellzahl zum Zeitpunkt 0,  $N$  = Zellzahl zum Zeitpunkt der Messung. Für den Versuch wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in 10ml Vollmedium in einer 10cm

Zellkulturschale ausgesät. Alle 24h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit neuem Vollmedium unter Zusatz von Decitabin (Endkonzentration von 1-5µM) behandelt. Als Kontrolle diente reines Vollmedium und des Weiteren Vollmedium mit DMSO-Zusatz, da Decitabin in DMSO gelöst wurde. Vierundzwanzig Stunden nach dem letzten Mediumwechsel wurden die Zellen pelletiert, mit PBS gewaschen und bis zur RNA-Extraktion und RT-PCR (Kapitel 2.2.4-8) bei -70°C eingefroren.

### **2.6.2 Behandlung von Zelllinien mit Trichostatin A, TSA**

Eine mögliche Einflussnahme auf die Expression von Genen kann auch durch Azetylierungen der Histone erfolgen. TSA kann als Histondeazetylasehemmer die Chromatinstruktur so verändern, dass Transkriptionsfaktoren binden können und Expression erfolgen kann.

Um dies zu untersuchen, wurden  $2 \times 10^5$  bis  $3 \times 10^5$  Zellen in 10ml Vollmedium in einer 10cm Zellkulturschale ausgesät. Nach ca. 20h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 10ml reinem Vollmedium (Kontrolle), Vollmedium mit DMSO-Zusatz (Lösungsmittel für TSA) oder Vollmedium mit 1µM TSA (ausgehend von einer 10mM Stammlösung in DMSO) versetzt. Nach 16h wurden die Zellen abzentrifugiert und bis zur RNA-Extraktion und RT-PCR (Kapitel 2.2.4-8) bei -70°C eingefroren.

### **2.7 Einfluss von Cisplatin auf die Expression von FAM107A**

Die Nierenzellkarzinomzelllinien RCC-1 und HTB-46 wurden auf ihre Sensitivität gegenüber Cisplatin und auf eine eventuelle Modulation der FAM107A-mRNA-Expression durch eine Cisplatinbehandlung getestet. Es wurden  $1 \times 10^5$  RCC-1-beziehungsweise  $1,3 \times 10^5$  HTB-46-Zellen in 2ml Vollmedium in einer 6-Loch-Zellkulturplatte ausgesät. Nach 24h wurden die Zellen in Vorversuchen mit je 12,5 beziehungsweise 25 und 50µM oder mit 2, 4, 6, 8 und 10µM Cisplatin (Endkonzentration im Medium) behandelt, um die Sensitivität gegenüber unterschiedlichen Cisplatin-Konzentrationen auszutesten. Die Zellen wurden nach 24h geerntet und gezählt. Die Wirkung von Cisplatin auf die Zellen wurde als Absterberate (Abnahme der Zellzahl in Prozent) nach einer Behandlung mit 2µM Cisplatin für 24h bestimmt. Ein Aliquot der Zellen wurde bei -70°C für die RNA-Extraktion und zur Überprüfung der Expression von FAM107A-mRNA mittels RT-PCR (Kapitel 2.2.4-8) eingefroren.



## **2. 8 Charakterisierung FAM107A ektopisch überexprimierender Zelllinien**

### **2.8.1 Methoden zur Analyse der Proliferation**

Als Proliferationsmarker wurde die Expression von Ki67/Mib1-Antigen gemessen. Proliferation-Related Ki-67/Mib1, im weiteren Verlauf als Ki67 bezeichnet, ist ein nukleäres Antigen, das mit Zellproliferation assoziiert ist und im aktiven Zellzyklus während der G<sub>1</sub>-, Synthese- (S-), G<sub>2</sub>- und Mitose- (M-)Phasen detektiert werden kann, nicht aber in ruhenden Zellen (G<sub>0</sub>-Phase) (Schlüter et al., 1993). Die Expression von Ki67 wurde mit Antikörpern gegen Ki67 sowohl immunzytochemisch als auch durchflusszytometrisch bestimmt. Mittels Zellzyklusanalyse wurde der DNA-Gehalt der Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen bestimmt. Um einen möglichen Einfluss von FAM107A-ORF-cDNA auf die DNA-Syntheserate zu detektieren, wurde die Proliferationsanalyse durch <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau durchgeführt. Als weiteres wurde eine Zellwachstumskurve aufgenommen.

#### ***2.8.1.1 Immunzytochemische Messung der Expression von Ki67***

Circa 24 Stunden nach Aussaat wurden die Zellen in 3,7%ig gepuffertem Formaldehyd fixiert. Im Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie, Universitätsklinikum des Saarlandes, wurden die Zellen in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden etwa 5-7µm dicke Schnittpräparate angefertigt, die auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgebracht wurden. Ki-67 wurde mit Antikörpern, die in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt worden waren (Protokoll nach Angaben des Herstellers), über die Avidin-Biotin-Komplex-(ABC)-Methode nachgewiesen. Als Peroxidase-chromogen diente DAB, das ein in Alkohol unlösliches braunes Endprodukt bildet. Als Eindeckmedium wurde Entellan<sup>®</sup> Neu verwendet. Im Automaten NexES<sup>®</sup> ICH wurden die zytologischen Präparate visualisiert und mit Hilfe eines Axioskop 2 Mikroskops und einer AxioCam MRc5 Mikroskopkamera in Form von True-Color Rasterbildern digitalisiert. Gespeichert wurde im proprietären ZVI-Format (CARL ZEISS), das durch Anwendung der Mikroskopiesoftware AxioVision LE Release 4.3 (CARL ZEISS) genutzt werden konnte, um die resultierenden Rasterbilder im JPEG- oder PNG-Format abzuspeichern.

### **2.8.1.2 Durchflussszytometrische Analyse der Expression von Ki67**

Es wurden  $0,7 \times 10^5$  (RCC-1-Zellen) beziehungsweise  $1,5 \times 10^4$  (HTB-46-Zellen) Zellen ausgesät. Nach 24h wurden die Zellen trypsinisiert und nach Zentrifugation für 5min mit PBS gewaschen. Permeabilisiert wurden die Zellen mit 0,5% Saponin. Anschließend wurden die Zellen für 15min in Puffer-2 geblockt, 5min zentrifugiert und mit 2,5µl monoklonalem Antikörper Anti-Humanen Ki-67/FITC Klon MIB-1 für 20min im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation für 5min wurden die Zellen zweimal mit Puffer-2 gewaschen. Nach Aufnahme in 400µl Puffer-2 wurden die Zellen durchflussszytometrisch analysiert (Kapitel 2.3.7).

### **2.8.1.3 Zellzyklusanalyse**

Die Analyse des Zellzyklus' erfolgte wie unter 2.5.2 beschrieben.

### **2.8.1.4 Proliferationsanalyse durch $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbau**

Die Proliferation kann durch Messung des Einbaus von radioaktiv markiertem Thymidin bei der DNA-Synthese bestimmt werden.

Je 500 beziehungsweise 1.000 Zellen wurden in 200µl Vollmedium als Triplika beziehungsweise als 6-facher Ansatz in einer 96-Loch-Zellkulturplatte ausgesät. Nach 11h wurden die Zellen zur weiteren Analyse in das Institut für Immunologie, LCL-Labor, Universitätsklinikum Essen, gegeben. Die Isotopenmarkierung erfolgte dort mit 10µl (= 37kBq) einer 1:10 verdünnten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Lösung für ca. 18h im Brutschrank. Nach Ernten und Trocknen der Zellfragmente auf einer Glasfaser-Filtermatte wurden 10ml Szintillationslösung Betaplate Scint<sup>®</sup> zugegeben. Die Messung wurde im 1.450 Mikrobeta Trilux Messgerät durchgeführt. Die Aktivität wurde in counts per minute (cpm) gemessen.

### **2.8.1.5 Proliferationskinetik**

Die Proliferationskinetik der stabil transfizierten Zelllinien wurde überprüft, indem die Zellen für sechs Tage kultiviert und täglich gezählt wurden. Je  $1 \times 10^4$  (RCC-1-Zellen) beziehungsweise  $2 \times 10^4$  (HTB-46-Zellen) Zellen wurden in 2ml Vollmedium in einer 6-Loch-Zellkulturplatte in einem Dreieransatz ausgesät. An den Tagen eins bis sechs wurden jeweils drei Zellansätze nach Trypsinierung mit 200µl Trypsin in 800µl DMEM aufgenommen. Nach Pellettieren bei 3.000U/min für 5min wurden die Zellen je nach Pelletgröße in 30-1.000µl PBS resuspendiert und in der Neubauer-Zählkammer gezählt.

## **2.8.2 *In-vitro*-Tumorigenität FAM107A ektopisch überexprimierender Zelllinien**

### **2.8.2.1 *Kultivierung von Zellen in Weichagar***

Für die Kultivierung von Zelllinien in Weichagar wurden zwei Schichten gegossen. Die Grundsicht bildete eine 1,2%ige Agarlösung (Gewicht/Volumen). Die Agarlösung wurde autoklaviert, auf 45°C abgekühlt und im Verhältnis 1:1 mit 37°C warmem, doppelt konzentrierten DMEM mit einem FCS-Gehalt von 25% gemischt. Dann wurde 1ml zügig und möglichst luftblasenfrei in jeweils eine Vertiefung einer 6-Loch-Zellkulturplatte gegossen. Zum Festwerden des Agars wurde die Platte bei RT gelagert. Für die eigentliche Kultivierungsschicht wurde eine 0,6%ige Agarlösung hergestellt, die ebenfalls vor der Verwendung auf eine Temperatur von 45°C gebracht wurde. Die zu testenden Zellen wurden in doppelt konzentriertem Medium (25% FCS) verdünnt, so dass sie in einer Konzentration von 10.000 beziehungsweise 6.000 Zellen pro 0,5ml Medium vorlagen. Die Zellsuspension wurde zu gleichen Teilen mit der 0,6%igen Agarlösung vermischt. Ein Milliliter dieses Gemischs wurde luftblasenfrei auf die Grundsicht gegeben. Die Weichagarplatten wurden bis zum Erstarren der Testschicht bei RT und dann im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach ca. 2-3 Wochen wurde die Anzahl der gewachsenen Zellkolonien unter dem Lichtmikroskop bestimmt, wobei nur Klone mit einem Durchmesser von über 1mm gezählt wurden.

### **2.8.2.2 *Messung der Survivin-Expression***

Die Expression von Survivin wurde mit dem monoklonalen anti-humanen Survivin-Fluorescein-Antikörper nachgewiesen. Es wurden  $7 \times 10^4$  Zellen der RCC-1-Zellen beziehungsweise  $1,5 \times 10^5$  Zellen der HTB-46-Zellen in einer 6-Loch-Zellkulturplatte für 23-24h kultiviert. Nach Ernten und Waschen der Zellen mit PBS wurden sie für 20min in 3,7%igem Formaldehyd fixiert. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen für 5min auf Eis mit Permeabilisierungslösung inkubiert. Geblockt wurden die Zellen für 15min auf Eis mit Puffer-2. Die Antikörperfärbung erfolgte nach Zugabe von 5µl spezifischem Antikörper in Puffer-2 bei 4°C für 20min im Dunkeln. Nach zweimaligem Waschen mit Puffer-2 wurden die Zellen in Puffer-1 aufgenommen und durchflusszytometrisch untersucht (Kapitel 2.3.7). Ausgewertet wurden die Originalhistogramme, die grafische Darstellung (Visualisierung) erfolgte mit der Reanalysierungssoftware „EXPO32 ADC Analysis“ (BECKMANCOULTER GMBH).

### **2.8.2.3 Test auf Invasivitätsmarker mittels Zymografie**

Mit Hilfe der Zymografie wird die substratspaltende Aktivität von MMP aus Zellkulturüberständen nach deren gelelektrophoretischen Auftrennung nachgewiesen. Die Enzyme werden in TrisGlycin-Gelatine-Gelen unter nichtreduzierenden Bedingungen entsprechend ihrer Molekulargewichte aufgetrennt. Durch Verwendung von SDS im Probenpuffer sind sie während des Gellaufes denaturiert. Die anschließende Inkubation im Reaktionspuffer ermöglicht den Proteasen nach vorangegangener Renaturierung die Spaltung des Substrats Gelatine dort, wo sie sich nach der elektrophoretischen Trennung befinden.

Der Zymografie-Assay wurde mit den Fertiggelen Novex<sup>®</sup> Zymogram Gel durchgeführt. Dazu wurden  $1 \times 10^4$  Zellen der stabil transfizierten Zelllinien in einer 96-Loch-Zellkulturplatte ausgesät. Mit 200µl Vollmedium wurden die Zellen über Nacht inkubiert. Nach 24h wurde das Medium abgesaugt und durch 40µl serumfreies Medium ersetzt. Nach weiteren 24h wurde das Medium abgenommen und bei -70 °C gelagert. Als Kontrolle für die Aktivität der Proteasen im fetalen Kälberserum diente Vollmedium und FCS-freies Medium aus einer Vertiefung der Kulturplatte, in der vorher Vollmedium war. Fünf Mikroliter des Zellüberstandes wurden mit 5µl Novex<sup>®</sup> Tris-Glycin SDS Sample Buffer (2X) unter nicht reduzierenden Bedingungen versetzt. Nach 15min Inkubation bei RT wurde das Zellüberstand/Puffer-Gemisch auf das Gel geladen. Bei 125Volt wurden die Proteasen 90min lang aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurde das Gel in 100ml 1XNovex<sup>®</sup> Zymogram Renaturing Buffer für 30min bei RT auf dem Schüttler bei leichter Bewegung inkubiert. Nach Dekantieren des Puffers wurde das Gel in 100ml 1XNovex<sup>®</sup> Zymogram Developing Buffer für 30min unter gleichen Bedingungen inkubiert. Der Puffer wurde durch frischen Novex<sup>®</sup> Zymogram Developing Buffer ersetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Das Gel wurde drei mal mit H<sub>2</sub>O für je 5min auf dem Schüttler gewaschen und anschließend für 1h in 100ml SimplyBlue<sup>®</sup>Safestain auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde das Gel zwei mal mit je 100ml H<sub>2</sub>O gewaschen, zunächst für 1h, im Anschluss für 2h. Die Auswertung erfolgte optisch und qualitativ ohne densitometrische Analyse durch Betrachtung über einer Durchlichtplatte und Dokumentation durch Aufnahme mit einer Digitalkamera.

### 2.8.3 Analyse der HLA-Expression

Die Expression von HLA-Oberflächenantigenen, und zwar HLA-A, -B und -C (MHC Klasse I Subtypen) sowie HLA-DR (Klasse II<sub>1</sub>) wurde mit den Antikörpern HLA-ABC-FITC beziehungsweise HLA-DR-PC5 (IG Klasse IgG<sub>1</sub>) überprüft.

Es wurden  $3 \times 10^5$  Zellen (RCC-1-Zellen) beziehungsweise  $4 \times 10^5$  Zellen (HTB-46-Zellen) in 5ml Vollmedium in T25-Flaschen ausgesät. Nach 24h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1ml Zelldissoziationspuffer abgelöst. Nach Aufnahme in 3ml Medium wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 100µl Puffer-1 aufgenommen. Die Zellen wurden mit je 20µl Antikörper für 30min bei 4°C inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen in 3,7%igem Formaldehyd für 15min fixiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 500µl Puffer-1 aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert, wobei 10.000 Ereignisse ausgewertet wurden (Kapitel 2.3.7). Ausgewertet wurden die Originalhistogramme mit Darstellung des Anteils HLA-exprimierender Zellen in Prozent. „EXP032 ADC Analysis“ wurde erneut zur Visualisierung eingesetzt. Da sich die beiden Fluoreszenzen (FL1 für den FITC und FL3 für den PC5-Antikörper) mit dem Durchflusszytometer nicht richtig kompensieren ließen, wurden in den nächsten beiden Versuchen die Antikörper getrennt zu den Zellen hinzugegeben und nach der Inkubation durchflusszytometrisch gemessen.

### 2.8.4 Behandlung der stabil transfizierten Zelllinien mit Cisplatin

Je  $1 \times 10^5$  RCC-1- beziehungsweise  $1,3 \times 10^5$  HTB-46-Zellen, native als auch stabil transfizierte, wurden in 2ml Medium in einer 6-Loch-Zellkulturplatte ausgesät und nach 24h für weitere 24h mit 2µM Cisplatin behandelt. Die Ansprechrate wurde durch die Absterberate (Zellzahl, siehe 2.7) und durch Zellzyklusanalyse (Kapitel 2.5.2) bestimmt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Zellkultursysteme

In vorliegender Arbeit wurden eine Reihe von Zelllinien verwendet, vornehmlich die beiden Nierenkarzinomzelllinien RCC-1 und HTB-46. Im Verlauf der Arbeit ergab sich die Möglichkeit, die Zellen genauer zu charakterisieren. Eine Vielzahl der Zellen konnte karyotypisiert werden (*Abb 57*). Des Weiteren wurden einzelne Zelllinien mit einer DNA-Fingerprinting-Analyse untersucht. Die Ergebnisse dieser Analysen werden im Folgenden kurz zusammengestellt.

#### 3.1.1 Charakterisierung der Zelllinien

##### 3.1.1.1 Morphologie und Karyotypisierung

Bei der lichtmikroskopischen Analyse der Zelllinien (Kapitel 2.1.1; *Abb 56*) ergaben sich im Vergleich mit der elektronisch verfügbaren Dokumentation (ATCC) keine nennenswerten morphologischen Abweichungen. Die Mehrzahl der verwendeten Tumorzelllinien wurde mittels Karyotypisierung charakterisiert. Je nach Verfügbarkeit wurden 2 bis 15 Metaphasen mittels G-Bänderung im Chromosomenlabor der Inneren Klinik (Tumorforschung), Universitätsklinikum Essen, untersucht (*Abb 57, Tab 8.10, S.153f.*). Die Karyotypisierung zeigte die für Tumorzellen typischen komplexen Karyotypen. Die einzelnen Metaphasen wiesen z.T. deutliche Unterschiede untereinander auf. Zum einen wurden erhebliche Unterschiede deutlich wie z.B. in den MCF7-Zellen Aberrationen bei Chromosom 3 und 6, die sich im eigenen, nicht aber im Karyotyp nach DSMZ-Angaben fanden (*Tab 3.1, S.56*). Auf der anderen Seite fanden sich ähnliche Aberrationen, die als klonale Marker eingestuft werden können wie z.B. Additionen bei 2(q), wobei der Karyotyp der DSMZ eine größere Auflösung zeigt. Eine chromosomale Instabilität, wie sie bei den Zelllinien beobachtet wurde, kommt häufiger vor und kann die Veränderungen im Karyogramm verursachen.

Die Karyogramme wurden besonders bezüglich Chromosom 3p betrachtet. Dabei wurden Aneuploidien von 3p bei den Zelllinien BLM, H23, H460, HBL-100, HeLa, HTB-45, MCF7, MV3, MZ2-MEL, RCC-1 und SN12c beobachtet. Eine geringe Auflösung bei der G-Bänderung verhinderte aber genauere Analysen und Aussagen bezüglich 3p.

**Tab 3.1: Exemplarische Gegenüberstellung des Karyotyps der Zelllinie MCF7 mit dem Karyotyp dieser Zellen, der in der Datenbank von der DSMZ angegeben wird.** Als Darstellung wurde der sogenannte „composite karyotype“, zusammengesetzter Karyotyp (cp) gewählt (Mitelmann, 1995). Klonale Marker sind unterstrichen.

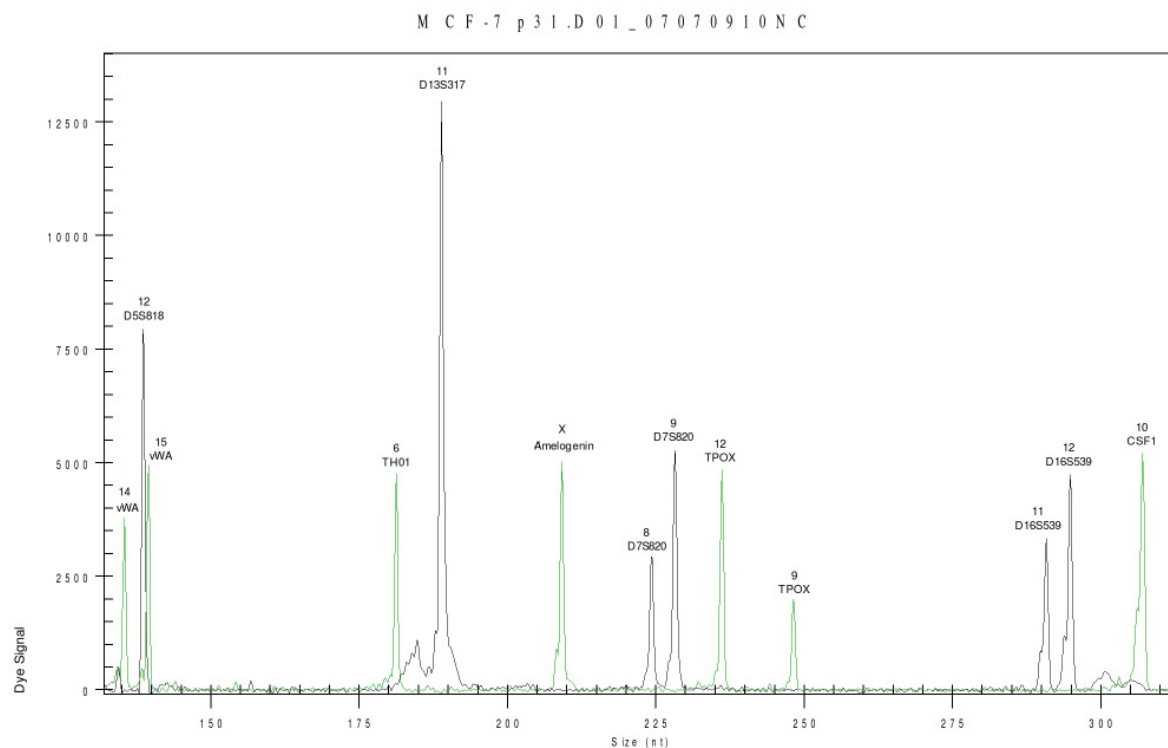
Zusammengesetzter Karyotyp MCF7	Karyotyp nach DSMZ, 2008
66~71,X-X,der(1)(q),+2,+ <u>add(2)(q)</u> ,+3,+der(3)(q),+del(3)(q),+4,+4,+ <u>5</u> ,+der(6)(q),+7, del(7)(q),+8,+9,+ <u>9</u> ,add(10)(p),+add(10)(p),+add(10)(p),+add(10)(q), + <u>11</u> , +der(11)(q),add(12)(p),-12,+14,-15,+16,+16,+17,+18,- <u>20</u> ,-20,+21,+21,+22,+22,+10 <u>mar</u> [cp8]	80~87,XX, add(X)(q27), <u>add(2)(q35-37)</u> x1-2,+2,+2,+3,+3, +4,+4,+ <u>5</u> ,+5, add(5)(p15),+6,+6,+6,del(6)(q25)x1-2,+7,+7,+7,add(7)(p11), add(7)(p14;hsr),+8, + <u>8</u> ,+ <u>9</u> , add(10)(q23),+ <u>11</u> ,+11, del(11)(q21q23),+12,+14,+14,+14,+15,+15, add(15)(p11), i(15q), + <u>16</u> ,+ <u>16</u> , add(16)(q24), +19,+19, add(19)(q13), add(19)(p13)x1-2,- <u>20</u> , + <u>21</u> , + <u>21</u> ,+22, +8 <u>mar</u>

### 3.1.1.2 DNA-Fingerprinting-Analyse

Von drei als Stichproben ausgewählten Zelllinien wurde eine DNA-Fingerprinting-Analyse bei der DSMZ durchgeführt (Abb 9). Die Geschlechtsbestimmung mit dem Gen Amelogenin (Amel) zeigte in allen drei Zelllinien das weibliche Geschlecht. Die Profile der Zelllinien MCF7 und HeLa zeigten im Vergleich mit dem Profil der Datenbank der DSMZ eine 100%ige Übereinstimmung (Tab 3.2, S.57). Daraus kann man schließen, dass die Zelllinien die von den Datenbanken beschrieben sind. Das Profil der Zelllinie HTB-46 (CAKI-1) zeigte im Vergleich mit der Datenbank ATCC und JCRB (JAPANESE COLLECTION OF RESEARCH BIORESOURCES, Shinjuku, Japan) eine Abweichung in einem Allel des Locus vWA. Diese einzelne Abweichung zu den beiden Datenbanken kann durch eine Instabilität der Mikrosatelliten verursacht sein. Abweichungen zu der Datenbank der DSMZ fanden sich bei der Zelllinie HTB-46 in den Loci D16, vWA, TH01, TPOX und CSF1PO. Diese Differenzen weisen auf eine andere Zelllinie als die in der DSMZ geführten hin, die diese spezielle Zelllinie wegen des Verdachtes auf Authentizitätsprobleme nicht mehr in der offiziellen Datenbank vorrätig hält (Dr. Dirks, DSMZ, persönliche Mitteilung).

**Tab 3.2: DNA-Profil 8 hochpolymorpher Loci von Short Tandem Repeats (STRs) und des Gens Amelogenin für die Geschlechtsbestimmung** (Analysen der DSMZ, AG MOLEKULARBIOLOGIE): Die Tabelle zeigt die Allele, die für die verschiedenen STR-Loci gefunden wurden. Das weibliche Geschlecht wird durch ein X in der Spalte Amel dargestellt.

Cell Line	D5	D5'	D13	D13'	D7	D7'	D16	D16'	vWA	vWA'	TH01	TH01'	TPOX	TPOX'	CSF1 PO	CSF1 PO'	Amel	Amel'
HELA (DSMZ)	11	12	12	14	8	12	9	10	16	18	7	7	8	12	9	10	X	X
HELA p56	11	12	14	14	8	12	9	10	16	18	7	7	8	12	9	10	X	X
MCF-7 (DSMZ)	12	12	11	11	8	9	11	12	14	15	6	6	9	12	10	10	X	X
MCF-7 p31	12	12	11	11	8	9	11	12	14	15	6	6	9	12	10	10	X	X
HTB-46 (CAKI-1)	11	12	11	12	8	12	12	12	17	17	6	8	8	11	10	11	X	X
CAKI-1 (ehemalig DSMZ)	11	12	11	12	8	12	12	13	14	16	9	9	8	10	11	12	X	X
Caki-1 (JCRB)	11	12	11	12	8	12	12	12	15	17	6	8	8	11	10	11	X	X
Caki-1 (ATCC)	11	12	11	12	8	12	12	12	15	17	6	8	8	11	10	11	X	X



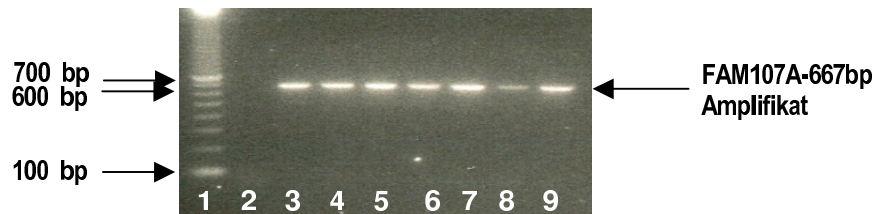
**Abb 9: DNA-Profil von MCF7-Zellen.** Elektropherogramm, erstellt bei der DSMZ, AG MOLEKULARBIOLOGIE. Die Amplifikationsprodukte der Multiplex-PCR-Reaktion wurden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mit der Software „CEQ 8000“ (BECKMANCOULTER GMBH) analysiert. Visualisierung der Ergebnisse (Tab 3.2, S.57) anhand des Beispiels der Zelllinie MCF7.

### 3.1.1.3 Analyse möglicher genomischer Veränderungen

Die Analyse der Karyotypen der Zelllinien konnte keinen Aufschluss über mögliche Deletionen oder Veränderungen im FAM107A-Locus geben, da die Auflösung der



Karyotypisierung zu gering war. Deshalb wurde mittels PCR untersucht, ob mögliche homozygote Deletionen von FAM107A im Genom der in vorliegender Arbeit verwendeten Tumorzelllinien vorkommen. Die PCR zeigte im Agarosegel eine Bande in der Höhe zwischen der 600bp- und 700bp-Bande der 100bp-Leiter in allen untersuchten Proben. Dies entsprach der erwarteten Bande von 667bp, was somit die Anwesenheit von FAM107A-Teilbereichen im Genom bestätigte (*Abb 10*).



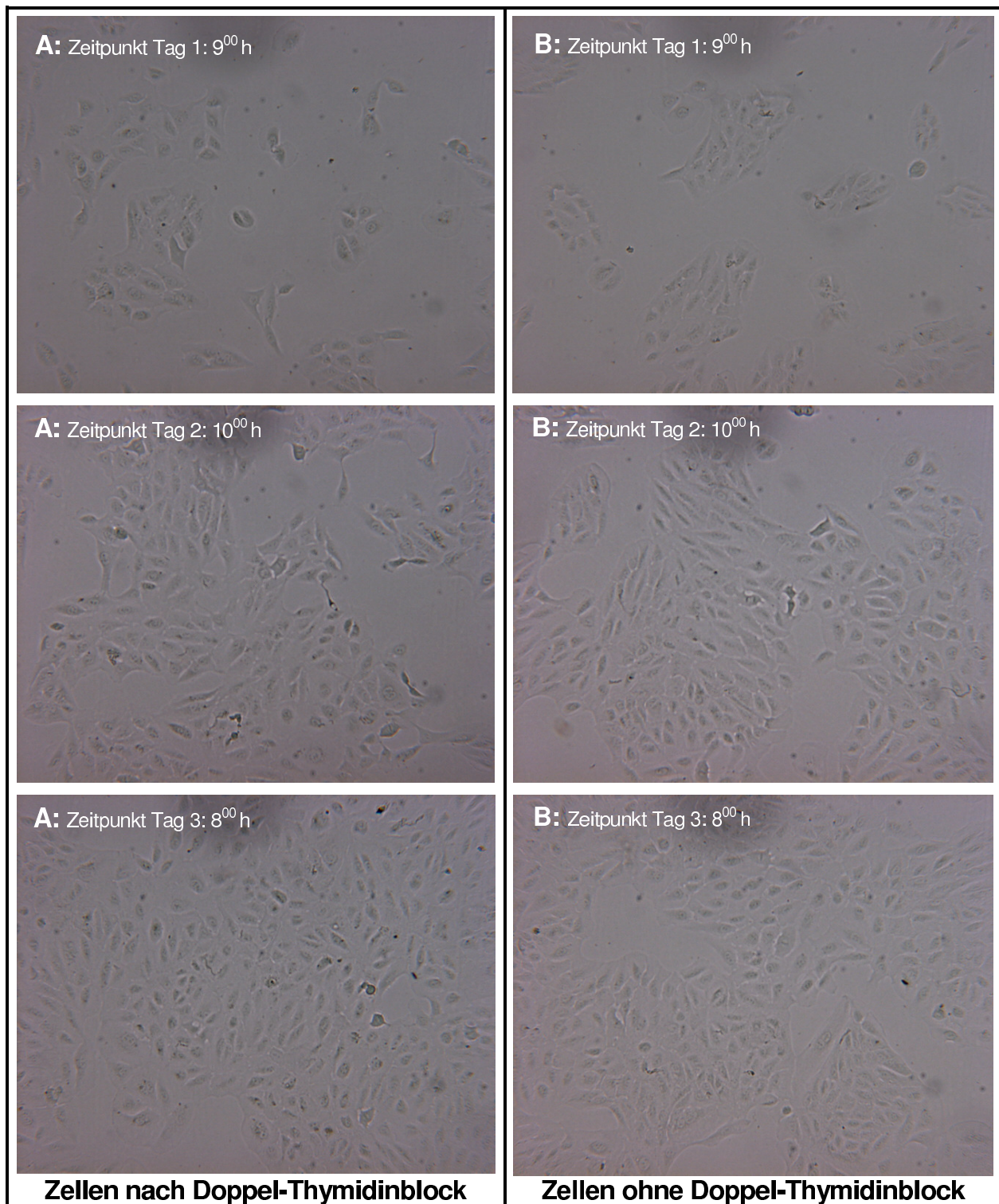
**Abb 10: Nachweis von FAM107A im Genom diverser Zelllinien.** Spurenbelegung: 1: 100bp-Leiter; 2: Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O); 3: RCC-1; 4: HTB-46; 5: SN12c; 6: MCF-7; 7: HBL-100; 8: H23; 9: ARPE-19.

### 3.1.2 Unterschiedliche Einflussgrößen auf Zellen, die in Zellkultur wachsen

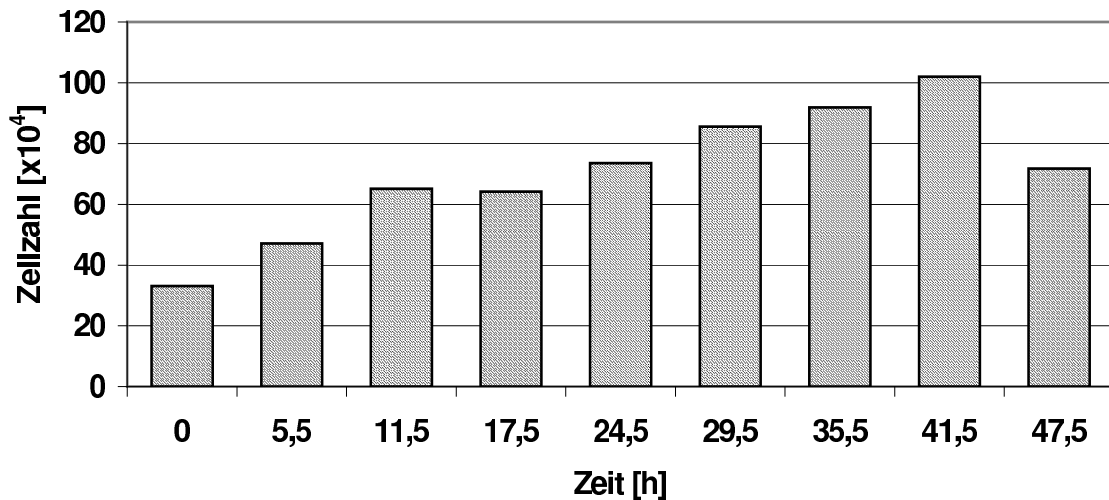
Die transkriptionelle Aktivität von Genen kann in Zellkulturen durch unabänderliche Faktoren wie den zirkadianen Rhythmus, den Zellzyklus, die Konfluenz oder die Temperatur beeinflusst werden. In Vorversuchen an ausgewählten Zelllinien sollte abgeklärt werden, ob die Expression von FAM107A-mRNA durch solche Parameter moduliert wird.

#### 3.1.2.1 Expression von FAM107A-mRNA in Abhängigkeit vom Zellzyklus und zirkadianen Rhythmus

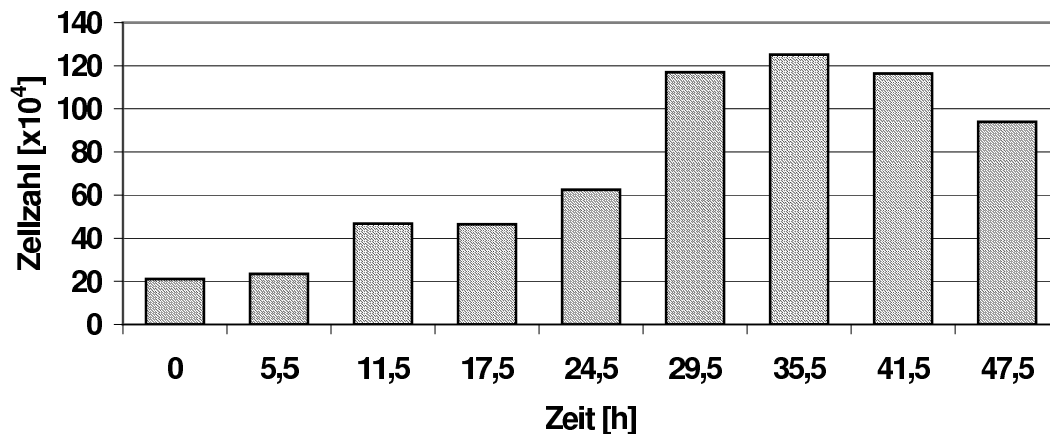
Alle Zelllinien, Thymidin-behandelt oder unbehandelt, proliferierten bis zur Konfluenz. Die Zellproben, die direkt nach dem Doppel-Thymidinblock geerntet wurden, zeigten im Vergleich zu den unbehandelten eine geringere Konfluenz und leicht vergrößerte Zellen (*Abb 11*). Die Zellzahlen nahmen bei den unbehandelten Proben bis zu 41,5h exponentiell zu (*Abb 12*). Dann führte ein Absterben der Zellen nach 47,5h zu einer verringerten Zellzahl. Bei den mit Thymidin behandelten Proben war zwar auch eine Zunahme der Zellzahl festzustellen, diese war aber nicht stetig exponentiell (*Abb 13*). Zunächst arretierten die Zellen bis zu einem Zeitraum von ca. 5h. Dann nahm die Zellzahl in dem Zeitraum bis 24h im Vergleich zu den unbehandelten Zellen weniger zu, was möglicherweise auf den Effekt der Thymidinbehandlung zurückzuführen war. Bis zu 35h nahm die Zellzahl weiter zu. Bei 41,5h war bereits eine Abnahme der Zellzahl festzustellen.



**Abb 11:** Zunahme der Konfluenz der ARPE-19-Zellen über einen Zeitraum von 48h. Alle Zelllinien, Thymidin-behandelt oder unbehandelt, proliferierten bis zur Konfluenz. [A] Zellen nach Doppel-Thymidinblock, [B] unbehandelte Zellen. Beispielhafte Abbildung von ARPE-19-Zellen des 1. Versuchs (Objektiv-Vergrößerung 40X).



**Abb 12:** Zunahme der Zellzahl in unbehandelten ARPE-19-Kulturen (MW, Darstellung ohne STABW, da  $n=2$ ).



**Abb 13:** Zunahme der Zellzahl in ARPE-19-Kulturen nach dem Doppel-Thymidinblock (MW, Darstellung ohne STABW, da  $n=2$ ).

Die Zellzyklus-Analyse der unbehandelten ARPE-19-Zellen zeigte, dass über 48h hinweg die Zellen gleichermaßen über die unterschiedlichen Zellzyklusphasen verteilt waren mit einem Hauptanteil der Zellen in der  $G_1$ -Phase (Abb14 1B). Zusätzlich zeigten die ARPE-19-Zellen eine weitere Population, die auf aneuploide ARPE-19-Zellen mit einem höheren DNA-Gehalt beziehungsweise Dubletten zurückzuführen war. Diese Dubletten können auf Zellaggregate hinweisen, die sich bei der Aufbereitung der Zellen nicht resuspendieren ließen. Ein vorgeschalteter Doppel-Thymidinblock bewirkte, dass der Hauptteil der ARPE-19-Zellen in der  $G_1/S$ -Phase war und somit eine synchronisierte Zellpopulation vorlag. Die Zellen verhielten sich schon 5,5h nach Doppel-Thymidinblock nicht mehr synchron. Nach 24h war eine annähernd gleiche Verteilung der ARPE-19-Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen messbar wie in den unbehandelten.

Die Zellzyklus-Analyse der HeLa-Zellen zeigte, dass über 48h hinweg die Zellen ebenfalls gleichermaßen über die unterschiedlichen Zellzyklusphasen verteilt waren mit einem Hauptanteil der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase. Die Zellzahl der HeLa-Zellen direkt nach dem Doppel-Thymidinblock war so gering, dass nicht bewertbar war, ob eine Synchronisation erfolgte.

Bei den SN12c-Zellen zeigte die Zellzyklus-Analyse auch eine über 48h gleichmäßige Verteilung der Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen mit einem Hauptanteil der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase. Ein vorgeschalteter Doppel-Thymidinblock bewirkte, dass der Hauptteil der Zellen in der G<sub>1</sub>/S-Phase war und somit eine annähernd synchronisierte Zellpopulation vorlag. Die Zellen verhielten sich über 11h nahezu synchron.

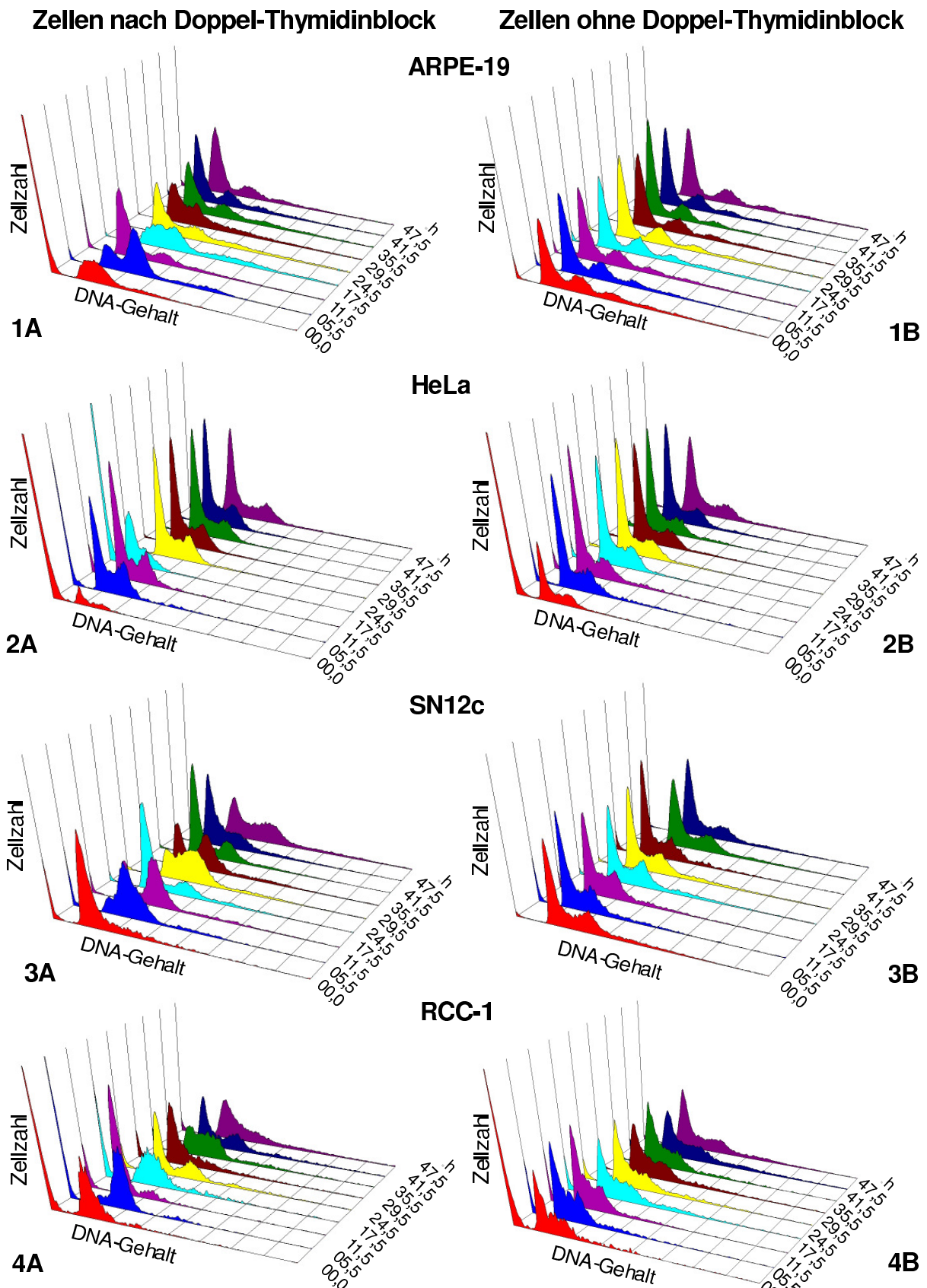
Bei den RCC-1-Zellen zeigte die Zellzyklus-Analyse ebenfalls eine über 48h gleichmäßige Verteilung der Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen mit einem Hauptanteil der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase. Ein vorgeschalteter Doppel-Thymidinblock bewirkte, dass der Hauptteil der Zellen in der G<sub>1</sub>/S-Phase war und somit eine weitgehend synchronisierte Zellpopulation vorlag. Die Zellen verhielten sich über 17h annähernd synchron.

Diese Ergebnisse der durchflusszytometrischen Zellzyklus-Analyse werden nur bildlich dargestellt und ausgewertet als Tendenzen, da die Proben einer Zelllinie sich hinsichtlich der absoluten Zellzahlen bei der durchflusszytometrischen Analyse unterschieden. Außerdem war die Fluoreszenzintensität der unterschiedlichen Proben eines Versuches nur annähernd gleich, was sich in leichten Verschiebungen der Histogrammkurven der Zellen, die sich in der G<sub>1</sub>- oder G<sub>2</sub>-Phase befanden, auf der x-Achse bemerkbar machte. Die Abbildung 14 veranschaulicht die Verteilung der untersuchten Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten (vgl. Abb 8).

Die Synchronisation der ARPE-19-, SN12c- und RCC-1-Zellen in der G<sub>1</sub>/S-Phase ermöglichte eine Zuordnung der Ergebnisse der FAM107A-RT-PCR mit dieser Zellzyklus-Phase. In allen untersuchten Zellen dieser Phase zeigte sich keine oder eine nur schwache FAM107A-Expression. Dies zeigte, dass die FAM107A-Expression nicht substantiell mit der G<sub>1</sub>/S-Zellzyklusphase korrelierte.

In HeLa-Zellen war über die gesamte Versuchsdauer keine FAM107-mRNA-Expression messbar. RCC-1-Zellen zeigten in Versuch 1 eine Expression von FAM107-mRNA in den mit Thymidin behandelten Proben an Tag 1 und 2 zu den





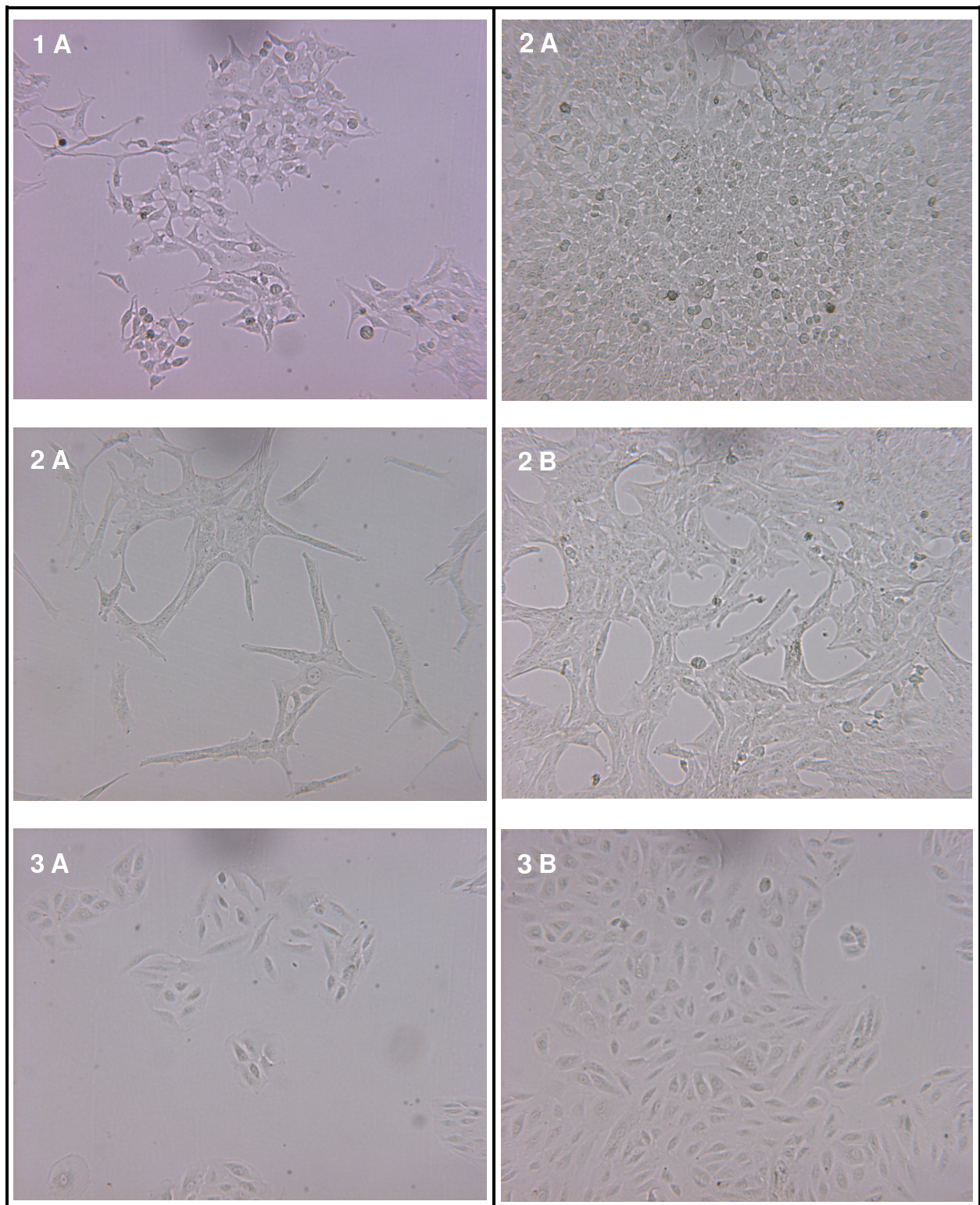
**Abb 14: Zellzyklusanalyse der unterschiedlichen Zelllinien über 48h.** 3D-Darstellung der Histogramme zu den 9 Zeitpunkten. Ergebnis eines repräsentativen Experimentes eines von zwei durchgeführten Versuchen. Die Zellzahl zu den unterschiedlichen Zeitpunkten ist auf der y-Achse dargestellt, der DNA-Gehalt, gezeigt mittels der emittierten Fluoreszenz, auf der x-Achse: 1: ARPE-19; 2: HeLa; 3: SN12c; 4: RCC-1. [A] nach Doppel-Thymidinblock, [B] ohne Doppel-Thymidinblock.

Zeitpunkten um 10h und um 14h, jedoch nicht in den unbehandelten zum gleichen Zeitpunkt. Die Wiederholung zeigte keine Expression von FAM107A-mRNA zu den gleichen Zeitpunkten. Die Expression wurde als zufällig gewertet, kann aber auch durch Artefaktbildung in der RT-PCR verursacht worden sein. Die SN12c-Zelllinie zeigte in Versuch 1 in 16 von 18 Proben eine Expression von FAM107A-mRNA, während in Versuch 2 in nur vier von 18 Proben eine FAM107A-Expression messbar war. Ebenso zeigten die ARPE-19-Zellen in Versuch 1 bei drei Proben eine Expression von FAM107A-mRNA, die aber sich in Versuch 2 nicht nachweisen ließ. Versuch 1 zeigte insgesamt eine Expression von FAM107A-mRNA in mehr Proben als Versuch 2. Zusammengefasst zeigten diese Versuche, dass in den untersuchten Zellsystemen die transkriptionelle Aktivität von FAM107A nicht zirkadian reguliert wurde.

### ***3.1.2.2 Einfluss der Konfluenz auf die Expression von FAM107A-mRNA***

Proliferierende adhärente Zellen in Kulturen wachsen bis zur Konfluenz und - in Abhängigkeit von ihrer Tumorigenität – teilweise trotz Kontaktinhibition auch darüber hinaus. Ein direkter Zell/Zellkontakt kann dabei auch die Expression von Genen beeinflussen.

Die untersuchten Zellen proliferierten unterschiedlich und zeigten ein inhomogenes Bild bei Konfluenz (*Abb 15*). Die HeLa-Zellen bedeckten bei Konfluenz die Wachstumsoberfläche beinahe vollständig. Die SN12c-Zellen dagegen arretierten bereits vorher und ließen einzelne Bereiche der Wachstumsoberfläche frei. Die ARPE-19-Zellen wuchsen ebenso bis zu einer fast vollständigen Konfluenz. HeLa- und SN12c-Zellen zeigten unabhängig von der Konfluenz keine Expression von FAM107A-mRNA. ARPE-19-Zellen zeigten die bekannte Expression von FAM107A-mRNA, aber ebenfalls unabhängig von der Konfluenz (Daten nicht gezeigt). Somit wurde die Expression von FAM107A-mRNA in den untersuchten Zellsystemen nicht durch den Konfluenzgrad der Kulturen beeinflusst.

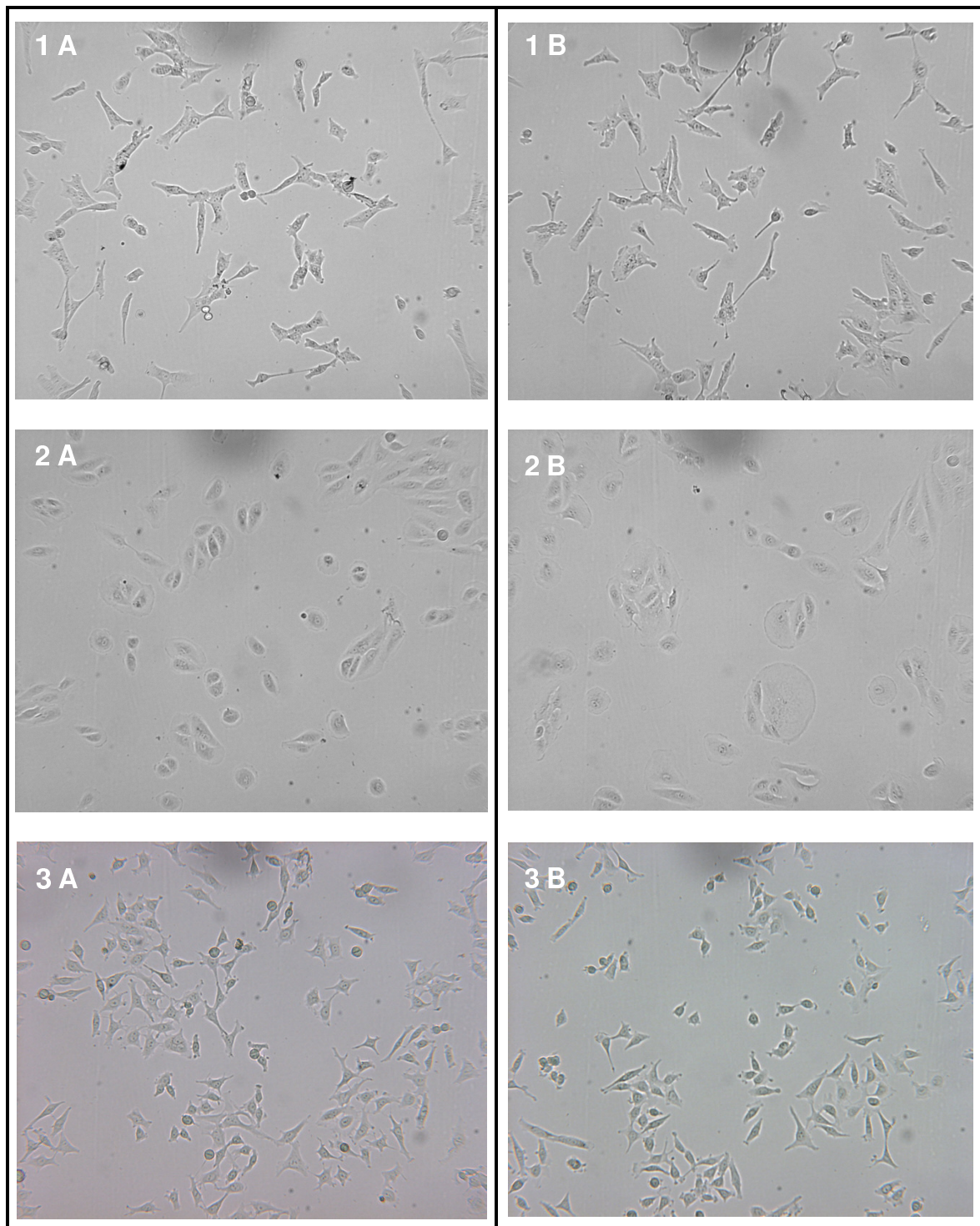


**Abb 15: Morphologie der Zellen nach Wachstum für 4 Tage.** Die untersuchten Zellen zeigten ein inhomogenes Bild bei Konfluenz. [A] Subkonfluente Zellen, [B] Konfluente Zellen. 1: HeLa p22; 2: SN12c p21; 3: ARPE-19 p37. Exemplarische Abbildungen von den Zellen aus einem von zwei durchgeführten Versuchen (p gibt die Passagenanzahl an, Objektiv-Vergrößerung 40X).



### 3.1.2.3 Einfluss der Temperatur auf die Zellproliferation und die Expression von FAM107A-mRNA

Eine Änderung der Umgebungstemperatur kann die Proliferation von Zellkulturzellen beeinflussen und eine Expression von Gentranskripten induzieren. Ein Beispiel dafür



**Abb 16: Morphologie der Zellen nach Hitze-Behandlung.** Nur die ARPE-19-Zellen zeigten eine Beeinflussung durch Hitze in der Morphologie. [A] unbehandelte Zellen, [B] Hitze-behandelte Zellen. 1: SN12c-Zellen; 2: ARPE-19-Zellen; 3: HeLa-Zellen. Exemplarische Darstellung von Kulturzellen aus einem von drei Versuchen (Objektiv-Vergrößerung 40X).

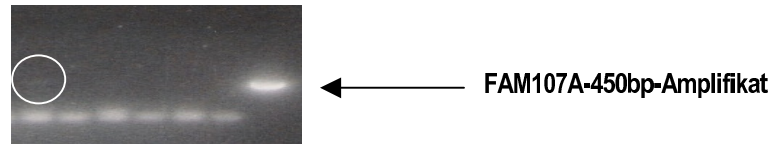


ist die transkriptionelle Aktivierung von HSF, HSP60, HSP70 und HSP89 $\alpha$  durch eine Hitzebehandlung in HeLa-Zellen (Abravaya et al., 1991).

Die Hitzebehandlung beeinflusste die Morphologie der SN12c- und HeLa-Zellen nicht, während sich in den ARPE-19-Zellen vereinzelt vergrößerte Zellen fanden (*Abb 16*). Die absolute Zellzahl war in den Hitze-behandelten HeLa- und SN12c-Zellen gegenüber den unbehandelten vermindert. Die ARPE-19-Zellen zeigten zwar in einem von drei Versuchen auch eine verminderte Zellzahl durch die Hitzebehandlung, in den anderen beiden Versuchen jedoch eine erhöhte (Daten nicht gezeigt). Eine vergleichbare Expression von FAM107A-mRNA war sowohl in den Hitze-behandelten als auch in den unbehandelten ARPE-19-Zellen messbar, nicht jedoch in den Hitze-behandelten und unbehandelten HeLa-Zellen (*Abb 17*). Die SN12c-Zellen exprimierten FAM107A-mRNA nicht. In zwei von drei Kontrollen fand sich eine schwach detektierbare Expression von FAM107A-mRNA (*Abb 18*). Somit wurde die Expression von FAM107A-mRNA durch eine Temperaturerhöhung für 60min mit anschließender Erholungsphase in den ARPE-19- und HeLa-Zellen nicht hochreguliert. In den SN12c-Zellen dagegen gab es einen Hinweis für eine mögliche negative Regulation der Expression von FAM107A-mRNA durch Temperaturerhöhung, die in weiteren Analysen überprüft werden müsste. Da aber die SN12c-Zellen in weiteren RT-PCR-Analysen auch eine heterogene FAM107A-mRNA-Expression zeigten, wurden die Unterschiede im vorliegenden Versuch zunächst als zufällig eingestuft. Eine Überprüfung der Induktion von HSP70 durch Hitze-Behandlung mit RT-PCR scheiterte an technischen Problemen (Daten nicht gezeigt).



**Abb 17: RT-PCR-Analyse der FAM107A-mRNA-Expression in Hitze-behandelten ARPE-19- und HeLa-Zellen.** RT-PCR-Produkte spezifisch für FAM107A-mRNA: Spurenbelegung: 1: 100bp-Leiter; 2: Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O); 3-4: ARPE-19 p40 Kontrolle +/-RT; 5-6: ARPE-19 p40 Kontrolle +/-RT; 7-8: ARPE-19 p40 Hitze behandelt +/-RT; 9-10: HeLa p25 Kontrolle +/-RT; 11-12: HeLa p25 Kontrolle +/-RT; 13-14: HeLa p25 Hitze behandelt +/-RT; 15: Positiv-Template-FAM107A. Exemplarische Darstellung.



**Abb 18: RT-PCR-Analyse der FAM107A-mRNA-Expression in Hitze-behandelten SN12c-Zellen.** RT-PCR-Produkte spezifisch für FAM107A-mRNA: Spurenbelegung: 1-2: SN12c p24 Kontrolle +/-RT; 3-4: SN12c p24 Kontrolle +/-RT; 5-6: SN12c p24 Hitze behandelt +/-RT; 7: Positiv-Template-FAM107A. Exemplarische Darstellung.

### 3.2 Analysen zur Expression von FAM107A-mRNA

Die FAM107A-mRNA-Expression, die in den vier Zelllinien ARPE-19, RCC-1, SN12c und HeLa in den Vorversuchen messbar war, ließ sich weder einem zirkadianen Rhythmus, noch dem Konfluenzgrad der Zellen oder einer Temperaturänderung zuordnen. Um einen Überblick über mögliche Expressionsunterschiede in unterschiedlichen Geweben und/oder Tumoren zu bekommen, wurden FAM107A-RT-PCR-Analysen in weiteren Zelllinien und - soweit verfügbar - in Gewebeproben (Operationspräparaten) durchgeführt. Aus logistischen Gründen standen nur in einigen Fällen korrespondierende Paare von Normal- und Tumorproben zur Verfügung. Deshalb wurden die Expressionsanalysen als reine „Screening“-Analyse betrachtet, bei der alle verfügbaren Proben unabhängig von besonderen Einbeziehungsweise Ausschlusskriterien untersucht wurden. Hinsichtlich der Auswertung der Lokalisationsangaben und der Morphologie anhand des ICD-O-3-Codes (siehe 2.1.1) ergaben sich keine weiterführenden Ergebnisse (Daten nicht gezeigt, Details nicht weiter aufgelistet). Im Vergleich zu den Literaturdaten gab es neun eigene Proben mit übereinstimmender ICD-O-3-Kodierung. Die eigenen Expressionsdaten wichen z.T. von jenen ab, die in der Literatur angegeben waren (Tabellen 8.2-8.5, S. 147f.).

#### 3.2.1 FAM107A-mRNA-Expression in Normalgewebeproben

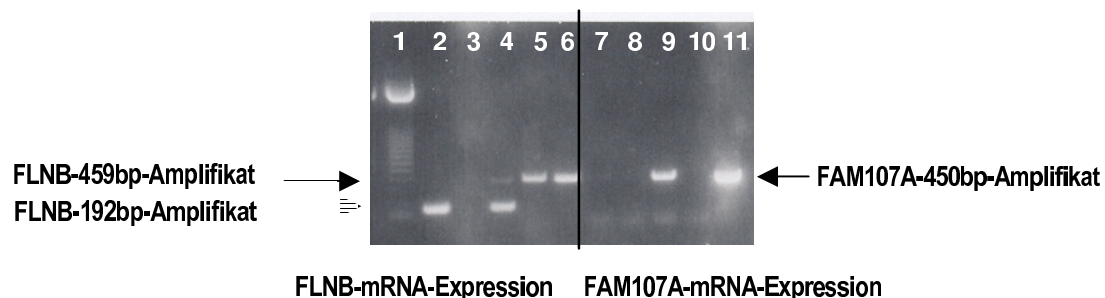
Zunächst wurde die Expression von FAM107A-mRNA in Normalgewebe untersucht, da das FAM107A-Transkript häufig in Normalgewebe exprimiert wird (Wang et al., 2000).

Dabei wurden zum einen Gewebeproben aus dem Hals-, Nasen- und Ohrenbereich untersucht, da Läsionen vom Chromosomenbereich 3p in Tumoren dieser Gewebe beschrieben wurden und hier zu Normalgewebe korrespondierende Tumorproben zur Verfügung standen. In Zungen-Normalgewebe war eine messbare Expression

von FAM107A-mRNA gegeben, dagegen keine in Parotis-Normalgewebe, wobei von beiden Proben kommerzielle Gesamt-RNA aus adultem Gewebe (STRATAGENE) zur Verfügung stand (Daten nicht gezeigt). Drei Proben von Tonsillengewebe unterschiedlicher Spender mit chronischer Tonsillitis wurden untersucht, zwei exprimierten FAM107A-mRNA (*Abb 19*).

Lungen-Normalgewebe (kommerzielle cDNA, BIOCHAIN) zeigte eine FAM107A-mRNA-Expression im Gegensatz zu keiner beziehungsweise einer nur spurenhafte messbaren Expression in einer Primärkultur peribronchialer Drüsenepithelzellen (*Abb 19*). Als weiteres Normalgewebe wurden Fibroblasten unterschiedlichen Ursprungs untersucht. In zwei von drei Fibroblastenproben, den humanen Vorhautfibroblasten (HFF) und der Fibroblastenzelllinie TuFi 35/01 wurde FAM107A-mRNA detektiert. Letztere Zelllinie war als tumorassoziierte Fibroblasten etabliert worden von einem Patienten mit primärem Plattenepithelkarzinom (Balló et al., 1999). Bei der Zelllinie TuFi 28/01 war FAM107A-mRNA in nur einer von drei RT-PCR messbar. Bei der anderen Zelllinie hingegen, TuFi 35/01, war nicht in allen durchgeführten RT-PCR-Analysen eine Expression von FLNB-mRNA detektierbar (*Abb 22*). Bei diesen Proben fehlten die Negativproben RT(-), da keine RNA, sondern nur cDNA der Zelllinien zur Verfügung gestellt worden war.

In drei humanen embryonalen Keratinozytenzelllinien, die aus Vorhaut isoliert worden waren, konnte keine Expression von FAM107A-mRNA detektiert werden (*Abb 22*). Zusammengefasst zeigte sich in tumorfreien Gewebeproben (Zungen-, Tonsillen- beziehungsweise Gewebe aus dem Respirationstrakt) ein heterogenes Bild hinsichtlich der Expression von FAM107A-mRNA.

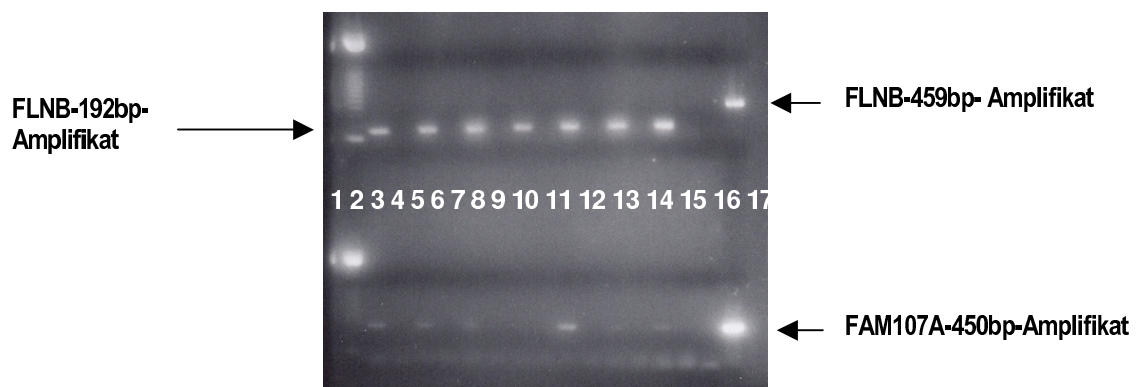


**Abb 19: RT-PCR-Analyse der FAM107A-mRNA-Expression in Normalgewebeproben.** RT-PCR-Produkte spezifisch für FLNB-mRNA (links) und FAM107A-mRNA (rechts): Spurenbelegung: 1: 123bp-Leiter; 2-3/7-8: Peribronchiales Drüsenepithel +/-RT; 4-5/9-10: Tonsille +/-RT; 6/11: Positiv-Template-FLNB-1 bzw. Positiv-Template-FAM107A (Laufzeit von 50min bei 120V).

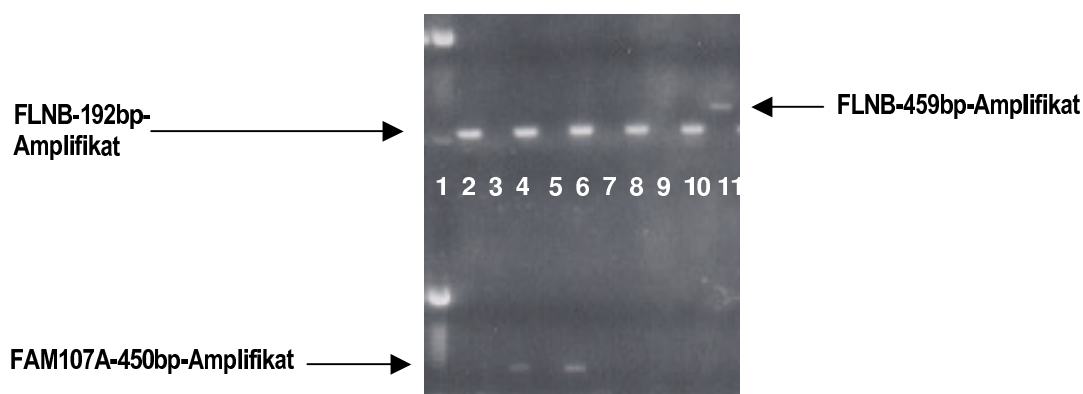
### 3.2.2 FAM107A-mRNA-Expression in Tumorzelllinien und Tumorgewebeproben

#### 3.2.2.1 FAM107A-mRNA-Expression in Nierenzellkarzinomzelllinien, Melanom-, Bronchial- und Zervixkarzinomzelllinien

Da sowohl in Nierenkarzinomzellen als auch in -zelllinien eine Herunterregulation von FAM107A-mRNA beschrieben wurde (Wang et al., 2000), wurden verfügbare Nierenkarzinomzelllinien und zusätzlich auch weitere Tumorzelllinien anderer Herkunft wie Melanom-, Bronchial- und Zervixkarzinomzelllinien mittels RT-PCR untersucht. In den Nierenkarzinomzelllinien RCC-1, SN12c, HTB-45 und HTB-46, den Melanomzelllinien MV3, BLM und SK-Mel-28 und den Bronchialkarzinomzelllinien H23 und H460 konnte die Expression von FAM107A-mRNA nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. Die verschiedenen Tumorzelllinien



**Abb 20: RT-PCR-Analyse der FAM107A-mRNA-Expression in Tumorzelllinien (1).** RT-PCR-Produkte spezifisch für FLNB-mRNA (oben) und FAM107A-mRNA (unten): Spurenbelegung: 1: 123bp-Leiter; 2-3: RCC-1 +/-RT; 4-5: HTB-45 +/-RT; 6-7: HTB-46 +/-RT; 8-9: HEK293 +/-RT; 10-11: SN12c +/-RT; 12-13: MV3 +/-RT; 14-15: BLM +/-RT; 16: Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O); 17: Positiv-Template-FLNB-1 (oben) bzw. Positiv-Template-FAM107A (unten; Laufzeit von 50min bei 120Volt).



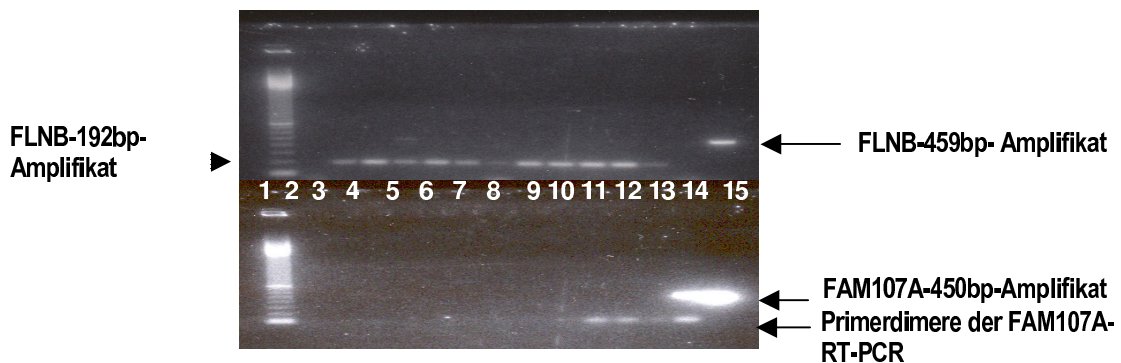
**Abb 21: RT-PCR-Analyse der FAM107A-mRNA-Expression in Tumorzelllinien (2).** RT-PCR-Produkte spezifisch für FLNB-mRNA (oben) und FAM107A-mRNA (unten): Spurenbelegung: 1: 123bp-Leiter; 2-3: SK-Mel-28 +/-RT; 4-5: H23 +/-RT; 6-7: H460 +/-RT; 8-9: HeLA +/-RT; 10-11: Fibroblasten +/-RT (Laufzeit von 50min bei 120Volt).

zeigten heterogene Ergebnisse (Abb 20). Bei Wiederholungen konnten die Resultate nur partiell reproduziert werden (Daten nicht gezeigt). Dasselbe galt für die

Zervixkarzinomzelllinie HeLa (*Abb 21*). Das zeigte, dass die Expression von FAM107A-mRNA einer Regulation unterliegen muss, die mit vorliegenden Analysen nicht geklärt werden konnte.

### 3.2.2.2 FAM107A-mRNA-Expression in Larynxkarzinomzelllinien, Oropharynxkarzinomzelllinien und -gewebeproben

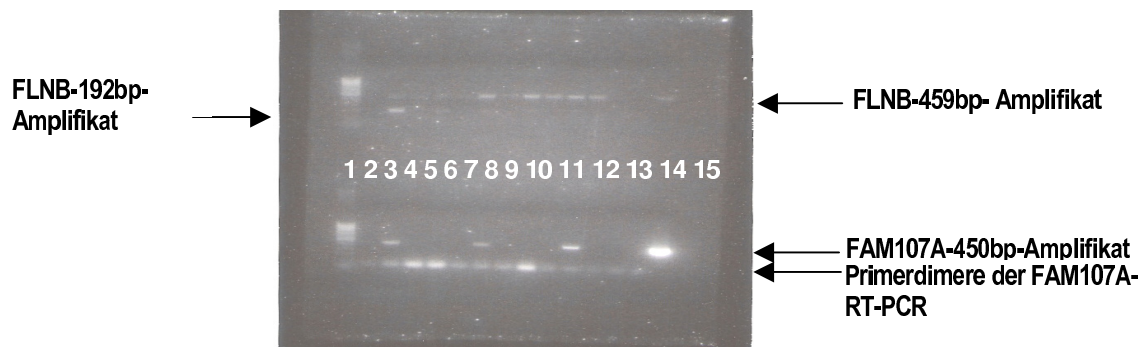
Im Vergleich zu den Normalgewebeproben aus dem Hals-, Nasen- und Ohrenbereich wurde das FAM107A-Transkript in acht Zelllinien aus Tumoren von Larynx-beziehungsweise Oropharynxkarzinomen mittels RT-PCR untersucht. Die untersuchte cDNA war im Gegensatz zu der anderer Proben als eine Verdünnung (1:10) zur Verfügung gestellt worden. Von dieser wurden 2 µl in die RT-PCR-Analyse eingesetzt bei gleicher PCR-Zyklenanzahl. Damit stand als Template nur ein Zehntel der normalerweise eingesetzten Molekülmenge zur Verfügung. In den untersuchten Karzinomzelllinien war keine FAM107A-mRNA-Expression messbar (*Abb 22*).



**Abb 22: RT-PCR-Analyse der FAM107A-mRNA-Expression in Larynx- bzw. Oropharynxkarzinomzelllinien.** RT-PCR-Produkte spezifisch für FLNB-mRNA (oben) und FAM107A-mRNA (unten): Spurenbelegung: 1: 100bp-Leiter; 2: Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O); 3: NHEK alpha; 4: NHEK beta; 5: NHEK gamma; 6: UD-SCC 2; 7: UD-SCC 5; 8: UD-SCC 7A; 9: UD-SCC 8; 10: UT-SCC 9; 11: UM-SCC 10A; 12: UM-SCC 17A; 13: TuFi 28/01; 14: TuFi 35/01; 15: Positiv-Template-FLNB-2 (oben) und Positiv-Template-FAM107A (unten). Es gab keine RT(-)-Proben, da die untersuchten Proben als cDNA zur Verfügung gestellt worden waren.

Im Vergleich zu den oben genannten Zelllinien standen drei Gewebeproben-Paare von Kopf- und Halstumoren, jeweils Tumor- und Normalgewebe aus Larynxkarzinomen beziehungsweise Tonsillenzellkarzinomen, bezeichnet als HNO-T1 bis 3 und HNO-N1 bis 3, zur Verfügung. Die FLNB-RT-PCR zeigte z.T. sehr schwache bis keine Banden der amplifizierten FLNB-cDNA und Banden, die auf genomische FLNB-DNA hinwiesen. Die FAM107A-RT-PCR jedoch zeigte in den korrespondierenden Normalgewebeproben eine FAM107A-mRNA-Expression, in den Tumorproben keine (*Abb 23*). Der Nachweis einer cDNA-Bande in der FAM107A-RT-

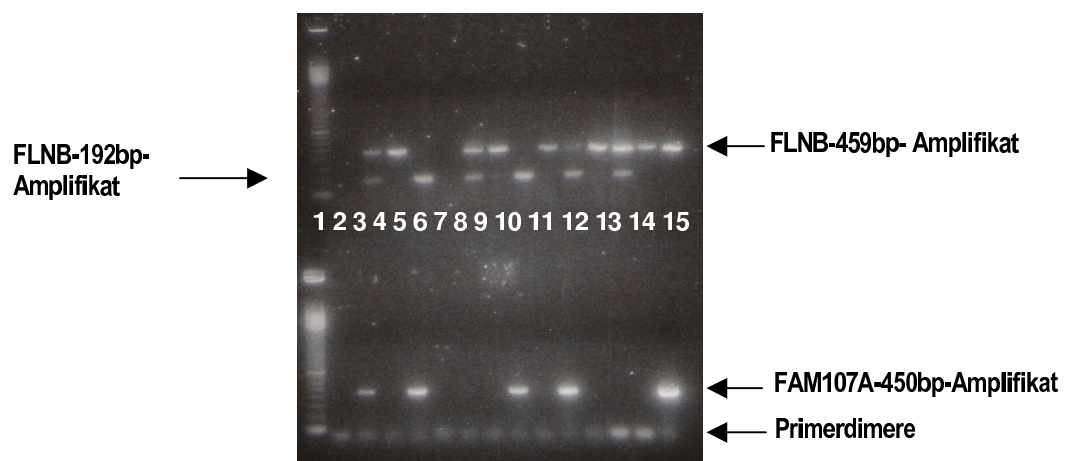
PCR sprach für den Erfolg der cDNA-Synthese. Die Wiederholungen der RT-PCRs zeigten z.T. sehr schwache bis keine FAM107A-mRNA-Expression (Daten nicht gezeigt). Trotz Abweichungen zwischen den Versuchen ließ sich die Tendenz feststellen, dass FAM107A-mRNA unter den Bedingungen der Sensitivität der qualitativen RT-PCR in den Normalgewebezellen messbar war, nicht dagegen in den Tumorzellen, wie es für ein TSG typisch ist.



**Abb 23: RT-PCR-Analyse der FAM107A-mRNA-Expression in den Gewebepaaren von Kopf- und Halstumoren.** RT-PCR-Produkte spezifisch für FLNB-mRNA (oben) und FAM107A-mRNA (unten): Spurenbelegung: 1: 100bp-Leiter; 2: Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O); 3-4: HNO-N1 +/-RT; 5-6: HNO-T1 +/-RT; 7-8: HNO-N2 +/-RT-; 9-10: HNO-T2 +/-RT; 11-12: HNO-N3 +/-RT; 13-14: HNO-T3 +/-RT; 15: Positiv-Template-FLNB-2 (oben) und Positiv-Template-FAM107A (unten).

### 3.2.2.3 FAM107A-mRNA-Expression in Retinoblastomzelllinien

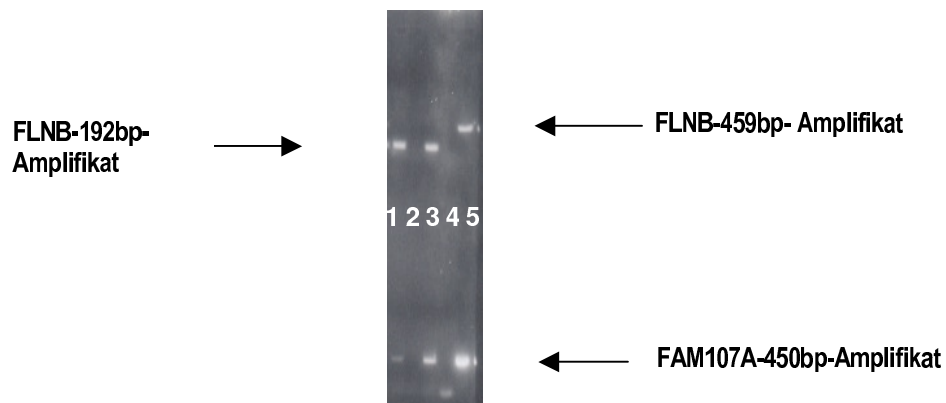
Da in der retinalen Zelllinie ARPE-19 FAM107A-mRNA in mehreren Versuchen detektiert werden konnte, sollte auch die Expression in Retinoblastomproben untersucht werden. Es wurden sechs Retinoblastomzelllinien analysiert. Von diesen exprimierten vier (RB 15, Weri\_Rb1, RB 355, RB 383) FAM107A-mRNA (Abb 24).



**Abb 24: RT-PCR-Analyse der FAM107A-mRNA-Expression in Retinoblastomzelllinien.** RT-PCR-Produkte spezifisch für FLNB-mRNA (oben) und FAM107A-mRNA (unten): Spurenbelegung: 1: 100bp-Leiter; 2: Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O); 3-4: RB 15 +/-RT; 5-6: Weri\_RB1 +/-RT; 7-8: RB 247C3 +/-RT; 9-10: RB 355 +/-RT; 11-12: RB 383 +/-RT; 13-14: RB Y79 +/-RT; 15: Positiv-Template-FLNB-2 (oben) bzw. Positiv-Template-FAM107A (unten). Auffallend deutliche Darstellung der Primerdimere. Exemplarische Darstellung.

### 3.2.3 FAM107A-mRNA-Expression in virusinfizierten Zellen

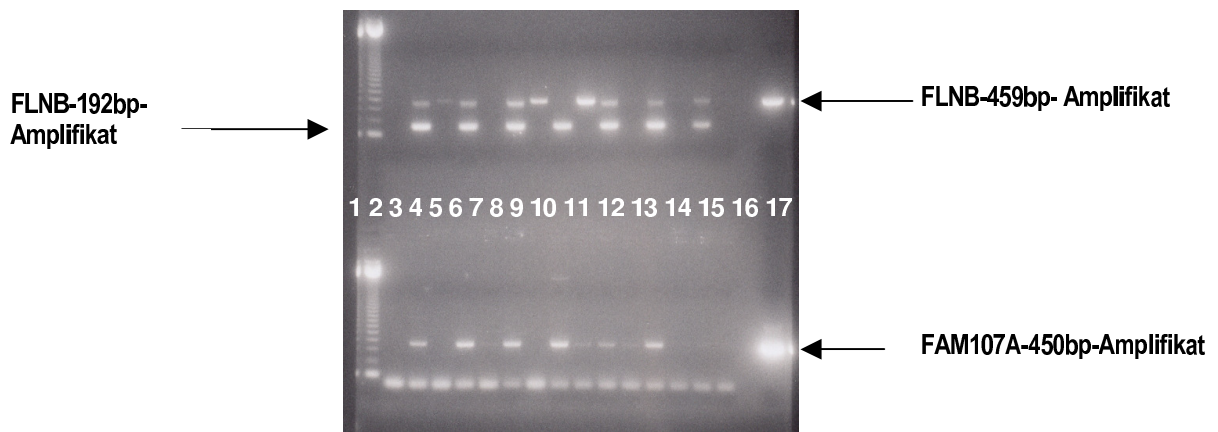
Zusätzlich wurden virusinfizierte Zellen hinsichtlich der Expression von FAM107A mit virusfreien Kontrollen verglichen. In einem Vorversuch waren Humane Vorhautzellen (HFF) nach Virusinfektion mit CMV-Laborstamm (MOI 2) mittels FAM107A-RT-PCR untersucht worden. In diesem Versuch wurde eine verstärkte Expression von FAM107A-mRNA in der virusbehandelten Probe detektiert (*Abb 25*), was den Anlass zu weiteren FAM107A-RT-PCR-Analysen von CMV-infizierten Zellen gab. Der Einfluss der Virusinfektion war von Interesse, da eine Infektion mit Viren zur Entstehung von Tumoren beitragen kann (Wagener, 1999).



**Abb 25: RT-PCR-Analyse der FAM107A-mRNA-Expression in virusinfizierten HFF-Zellen.** RT-PCR-Produkte spezifisch für FLNB-mRNA (oben) und FAM107A-mRNA (unten): Spurenbelegung: 1-2: HFF +/-RT; 3-4: HFF nach Infektion +/-RT; 5: Positiv-Template-FLNB-1 (oben) bzw. Positiv-Template-FAM107A (unten; Laufzeit von 50min bei 120Volt).

So wurde die FAM107A-Expression auch in der primären retinalen Pigmentepithelzelllinie RPE und 2, 4, 8 und 24h nach deren Infektion mit CMV-Patientenstamm (MOI 1) überprüft. FAM107A-mRNA wurde in allen Proben exprimiert, wobei auch PCR-Produkte in einzelnen RT-Negativkontrollen detektiert wurden, und zwar in Ansätzen ohne Reverse Transkriptase, RT(-)-Proben (*Abb 26*). Diese RT-PCR-Produkte wiesen jedoch nicht FAM107A in genomischer DNA nach, da die Amplifikation der genomischen FAM107A-Sequenz unter den gewählten Bedingungen der RT-PCR nicht möglich war. In der FLNB-RT-PCR waren deutliche genomische Banden von FLNB-DNA zu sehen. FAM107A-mRNA wurde unabhängig von der Infektion in humanen Vorhautfibroblasten und retinalem Epithelgewebe exprimiert. In ersteren schien die FAM107A-mRNA-Expression durch Virusinfektion stimuliert zu werden.





**Abb 26: RT-PCR-Analyse der FAM107A-mRNA-Expression in RPE-Zellen.** RT-PCR-Produkte spezifisch für FLNB-mRNA (oben) und FAM107A-mRNA (unten): Spurenbelegung: 1: 123bp-Leiter; 2: Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O); 3-4: RPE Kontrolle (2h) +/-RT; 5-6: RPE, 2h nach Infektion +/-RT; 7-8: RPE Kontrolle (4h) +/-RT; 9-10: RPE 4h nach Infektion +/-RT; 11-12: RPE Kontrolle (8h) +/-RT; 13-14: RPE 8h nach Infektion +/-RT; 15-16: RPE Kontrolle (24h) +/-RT; 17: nicht belegt; 18: Positiv-Template-FLNB-1 (oben) und Positiv-Template-FAM107A (unten; Laufzeit von 50min bei 120Volt).

### 3.3 Untersuchungen zur epigenetischen Beeinflussung der Expression von FAM107A-mRNA

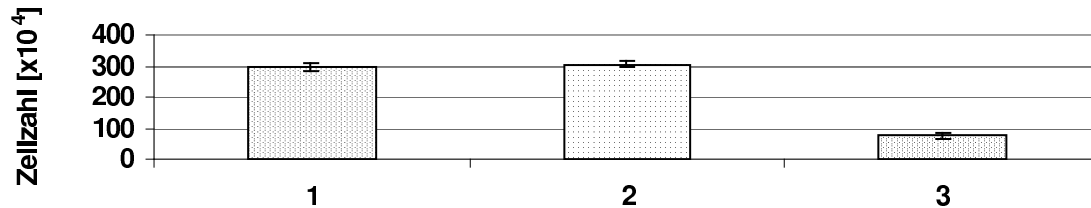
Die Transkription von Genen, speziell von TSG, kann auch epigenetisch moduliert werden. Eine fehlerhafte DNA-Methylierung und/oder Histondeazetylierung können zur Abschaltung der transkriptionellen Genaktivität führen. Es wurden daher diverse Zelllinien mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor Decitabin behandelt und in einem weiteren Versuch die Nierenkarzinomzelllinie RCC-1 und die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 mit dem Histondeazetylasehemmer TSA, um zu überprüfen, ob die Behandlung zu einer veränderten FAM107A-Genaktivität führt.

#### 3.3.1 Behandlung von Zelllinien mit 5-Aza-2'-desoxycytidin (Decitabin)

Um zu testen, ob die FAM107A-mRNA-Expression durch DNA-Methylierung beeinflusst wird, wurden die Zelllinien RCC-1, HTB-46, SN12c, BLM, MCF7, HBL100 und H23 mit Decitabin behandelt. Der Einfluss von Decitabin auf die Zelllinien zeigte sich in der verminderten Zellzahl der behandelten Proben (*Abb 27*) und einer z.T. veränderten Morphologie (*Abb 28*). Die Zellen wurden z.T. augenscheinlich voluminöser. Die unbehandelten beziehungsweise mit DMSO-behandelten Kontrollproben wuchsen dagegen bis zur Konfluenz. In Abhängigkeit von der Art der Zelllinie und der Anzahl der Behandlungstage verringerte sich die Zellzahl auf ca. 20 bis 30% im Vergleich zur unbehandelten Probe. Dabei zeigte sich, dass sich mit steigender Anzahl an Tagen die Zellzahl weiter verringerte, während die Höhe der

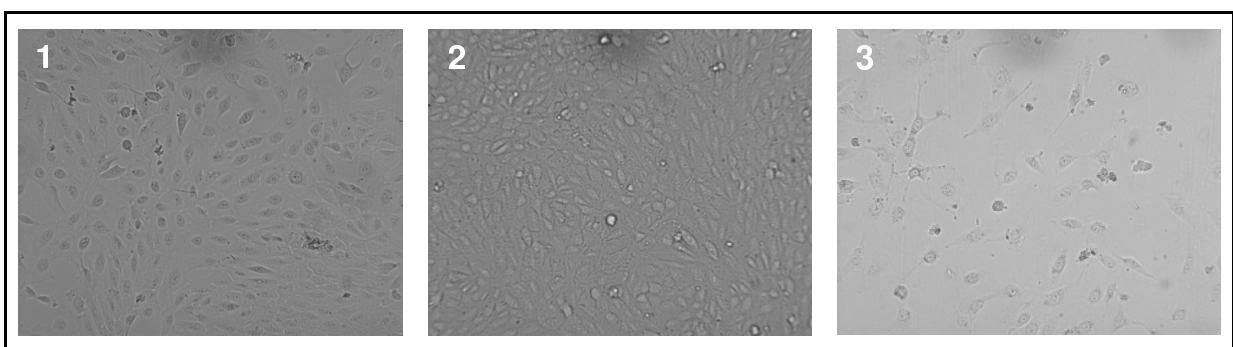


Konzentration von Decitabin von 1, 2 bis 5  $\mu\text{M}$  Endkonzentration keinen Einfluss auf die Zellzahl hatte (Tab 8.9, S.153). Die Verringerung der Zellzahl wurde möglicherweise durch eine geringere Proliferation und/oder durch ein Absterben der Zellen durch die Decitabin-Behandlung verursacht.

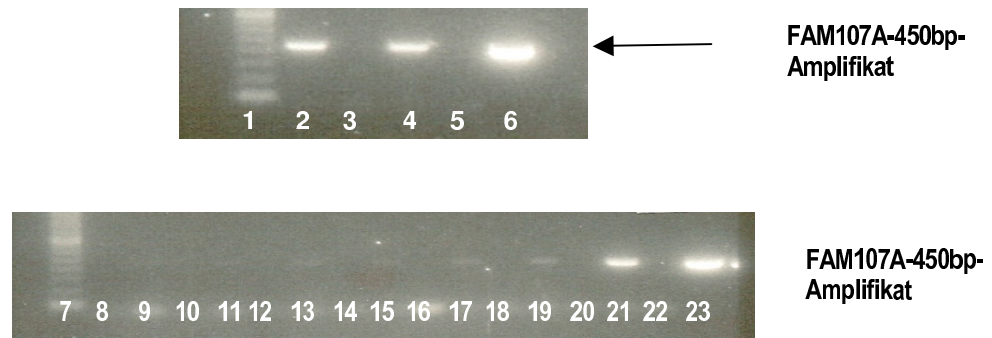


**Abb 27: Einfluss einer Decitabinbehandlung auf die Zellzahl am Beispiel der Linie RCC-1.** Am dritten Tag der Behandlung wurden die Zellen pelletiert und gezählt. Die Behandlung mit 2  $\mu\text{M}$  Decitabin über drei Tage führte zu einer Zellzahlabnahme. Abhängige Triplika eines Versuches, MW  $\pm$  STABW, n=3: 1: RCC-1, unbehandelt; 2: RCC-1 mit DMSO behandelt; 3: RCC-1 mit Decitabin behandelt.

Die FAM107A-mRNA-Expression, analysiert mittels RT-PCR, wurde in sechs der sieben untersuchten Zelllinien nicht durch die Decitabinbehandlung beeinflusst. In der Nierenkarzinomzelllinie RCC-1 wurde jedoch die Expression von FAM107A-mRNA messbar hochreguliert (Abb 29, exemplarische Darstellung), was durch eine zweimalige Wiederholung der Decitabinbehandlung (hierbei Versuchsdurchführung im Triplikat) bestätigt wurde. Somit scheint der Promotor von FAM107A und/oder von Genen, die die Expression von FAM107A beeinflussen, in den RCC-1-Zellen methyliert zu sein. Alle anderen untersuchten Zelllinien zeigten keine Modulation der FAM107A-mRNA-Expression durch Decitabin-Behandlung.



**Abb 28: Morphologie von Decitabin-behandelten und -unbehandelten RCC-1-Zellen.** 1: RCC-1, unbehandelt; 2: RCC-1 mit DMSO behandelt; 3: RCC-1 mit Decitabin behandelt (Objektiv-Vergrößerung 40X).

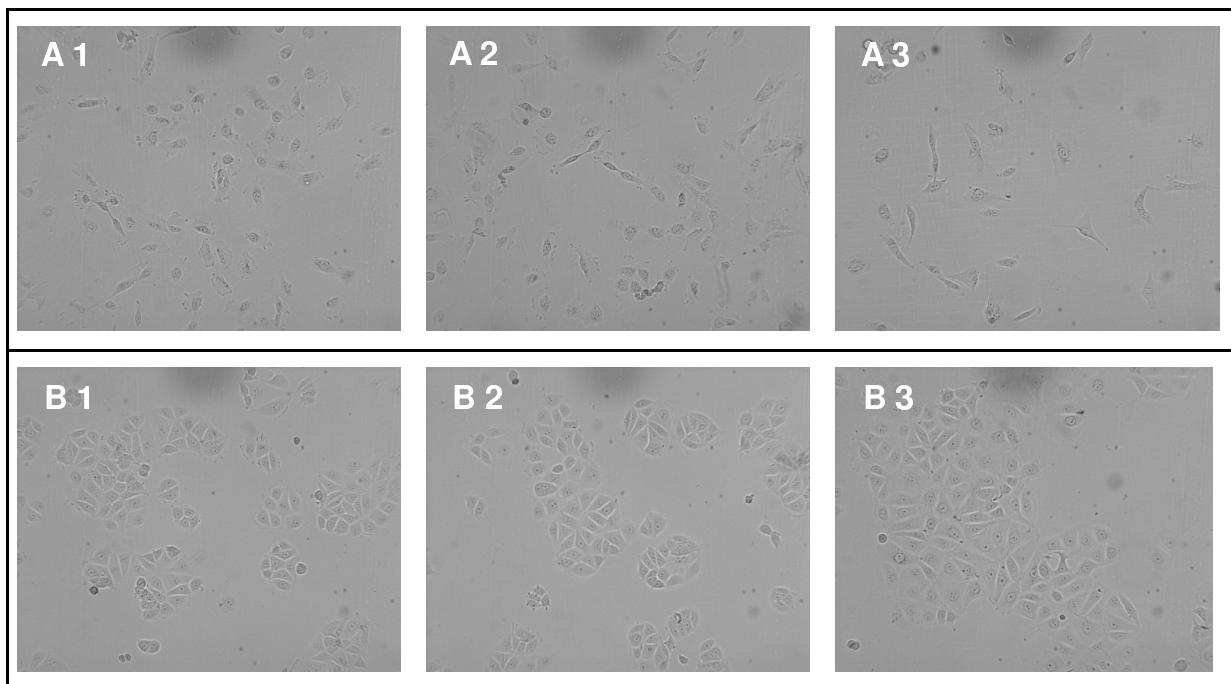


**Abb 29: Induktion der Expression von FAM107A-mRNA durch Decitabin-Behandlung in RCC-1-Zellen.** Spurenbelegung: 1: 100bp-Leiter; 2-5: RCC-1, behandelt mit Decitabin, +/-RT; 6: Positiv-Template-FAM107A; 7: 100bp-Leiter; 8: Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O); 9-14: RCC-1, unbehandelt +/-RT; 15-20: RCC-1, behandelt mit DMSO +/-RT; 21-22: RCC-1, behandelt mit Decitabin +/-RT; 23: Positiv-Template-FAM107A.

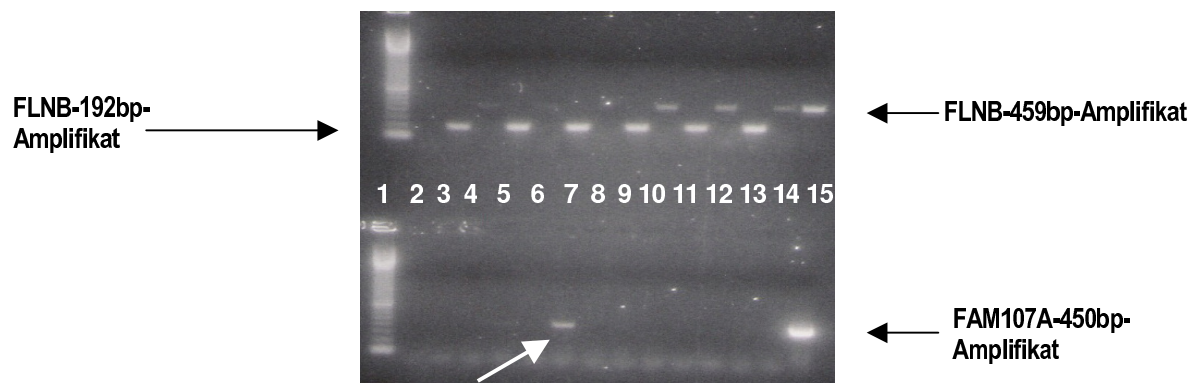
### 3.3.2 Behandlung von Zelllinien mit Trichostatin A (TSA)

Die Transkription eines Gens kann auch durch die Chromatinstruktur moduliert werden. Diese kann z.B. dadurch verändert werden, dass Histone, die mit DNA komplexiert in den Zellen vorliegen, azetyliert werden.

Die Nierenkarzinomzelllinie RCC-1, deren FAM107A-mRNA-Expression wechselhaft war und die Mammakarzinomzelllinie MCF7, die FAM107A-mRNA nicht exprimierte, wurden mit dem Deazetylase-Hemmer TSA behandelt, was augenscheinlich zu einer Vergrößerung der Zellen führte (RCC-1-Zellen, *Abb 30*). Die Zellzahl in den RCC-1- und MCF7-Kulturen war gegenüber den unbehandelten Zellen nach TSA-Behandlung verringert. Die RCC-1-Zellen zeigten in der mit TSA-behandelten Probe eine im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle deutlichere Bande in der gelelektrophoretischen Analyse der RT-PCR-Amplifikate (*Abb 31*), was durch eine zweimalige Wiederholung der TSA-Behandlung bestätigt wurde. Dieses Ergebnis lässt die Tendenz vermuten, dass die Expression von FAM107A-mRNA in der Nierenkarzinomzelllinie RCC-1 durch TSA verstärkt werden konnte. Dieser Effekt kann spezifisch für RCC-1 sein, da die Behandlung mit TSA keine messbare Expression von FAM107A-mRNA in den MCF7-Zellen induzierte (Daten nicht gezeigt).



**Abb 30: Morphologie von RCC-1-Zellen nach Behandlung mit TSA.** Die Zellzahl in den TSA-behandelten Zellkulturen war gegenüber den unbehandelten Kontrollen verringert. [A] RCC-1, [B] MCF7, wobei jeweils 1: unbehandelte Kontrolle; 2: DMSO-behandelt; 3: TSA-behandelt (Objektiv-Vergrößerung 40X).

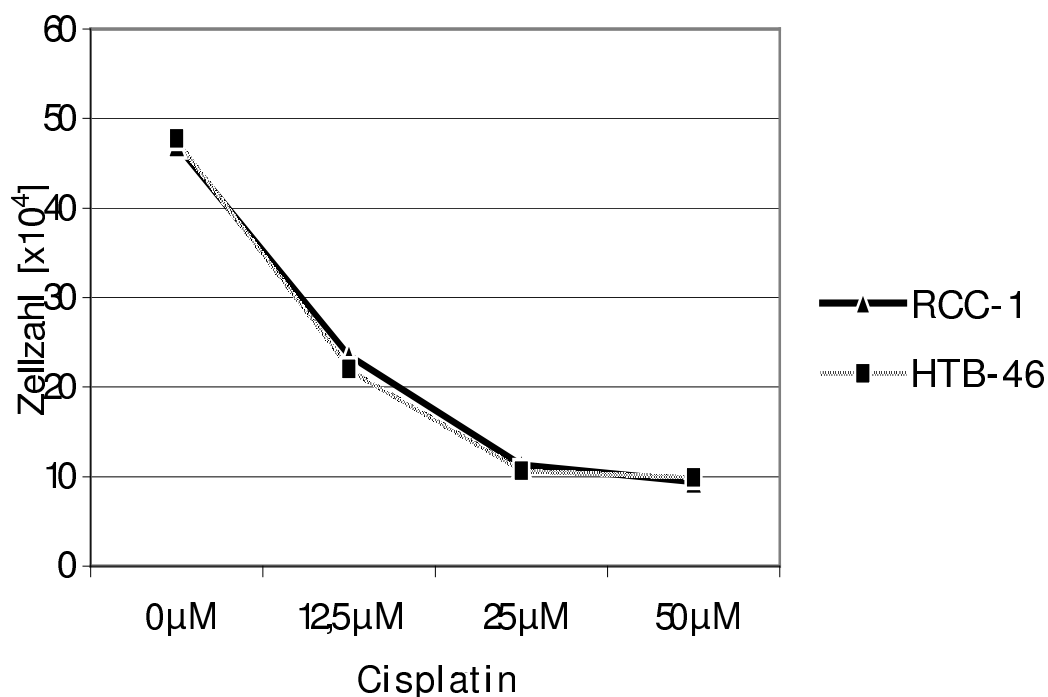


**Abb 31: Analyse der FAM107A-mRNA-Expression nach Behandlung von RCC-1-Zellen mit TSA.** RT-PCR-Produkte spezifisch für FLNB-mRNA (oben) und von FAM107A-mRNA (unten): Spurenbelegung: 1: 100bp-Leiter; 2: Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O); 3/4: RCC-1 Kontrolle +/-RT; 5/6: RCC-1 DMSO-behandelt +/-RT; 7/8: RCC-1 TSA-behandelt +/-RT; 9-14: RCC-1 unbehandelt +/-RT; 15: Positiv-Template-FLNB-2 (oben)/Positiv-Template-FAM107A (unten; exemplarische Darstellung).

### 3.4 Analyse der FAM107A-mRNA-Expression nach Behandlung von Zelllinien mit Cisplatin

Die Behandlung von Zellkulturzellen mit Cisplatin führt zu einer veränderten Zellzyklusverteilung und zu einer veränderten Expression von Zellzyklus-regulatorischen Proteinen.

RCC-1- und HTB-46-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Cisplatin, das dem Zellkulturmedium zugesetzt wurde, behandelt. Dabei wurde für die beiden Zelllinien für eine Behandlungsdauer von 24h die mittlere letale Dosis ( $LD_{50}$ ) bestimmt, die unter den gegebenen Testbedingungen unterhalb von  $12,5\mu\text{M}$  Cisplatin lag (Abb 32). Nach Behandlung der Zellen mit geringeren Konzentrationen an Cisplatin als  $12,5\mu\text{M}$  zeigten die Zellen schon nach  $2\mu\text{M}$  Cisplatin-Behandlung für 24h eine verstärkte Absterberate gegenüber den unbehandelten Zellen (Daten nicht gezeigt).



**Abb 32: Einfluss von Cisplatin auf die Zellzahl von RCC-1- bzw.- HTB-46-Zellen.** (MW ohne STABW, da  $n=2$ ).

In der Zellzyklusanalyse der mit  $2\mu\text{M}$  Cisplatin behandelten Zellen wurde eine Verschiebung der Verteilung der Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen detektiert, jedoch keine apoptotischen Zellen, detektierbar als Sub $G_1$ -Fraktion. Nach Cisplatin-Behandlung war ein verringerter Anteil an Zellen in der  $G_1$ -Phase, ein größerer Anteil in der S- und der  $G_2/M$ -Phase, so dass ein  $G_2$ -Arrest detektiert wurde.

Für weitere Experimente wurden die Zelllinien mit 2µM Cisplatin behandelt, um zu testen, ob die Expression von FAM107A-mRNA beeinflusst wird.



**Abb 33: Analyse der FAM107A-mRNA-Expression nach Behandlung von RCC-1- und HTB-46-Zellen mit 2µM Cisplatin.** RT-PCR-Produkte spezifisch für FLNB-mRNA (oben) und FAM107A-mRNA (unten): Spurenbelegung: 1: 100bp-Leiter; 2/3: HTB-46 Cisplatin +/-RT; 4/5: RCC-1 +/-RT; 6/7: RCC-1 Cisplatin +/-RT; 8/9: HTB-46 +/-RT; 10/11: HTB-46 Cisplatin +/-RT; 12: Positiv-Template-FLNB-2 (oben)/Positiv-Template-FAM107A (unten).

Die RT-PCR-Analyse zeigte keine messbare Expression von FAM107A-mRNA in den behandelten oder unbehandelten Zellen (Abb 33). Somit wurde die Expression von FAM107A-mRNA durch Behandlung mit 2µM Cisplatin nicht induziert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die bislang beschriebenen Versuche zeigten, dass die Expression von FAM107A-mRNA in den untersuchten Zellsystemen nicht durch zirkadianen Rhythmus, Konfluenzgrad der Kulturen oder Temperaturerhöhung substantiell reguliert wurde. Expressionsanalysen von FAM107A-mRNA in diversen Tumorzelllinien zeigten in qualitativer RT-PCR unterschiedliche Expressionsmuster. Auffällig war eine Herunterregulation von FAM107A-mRNA, die sowohl in Zelllinien aus Tumoren von Larynx-beziehungsweise Oropharynxkarzinomen als auch im Primärmaterial nachweisbar war. Eine eindeutige Expression von FAM107A-mRNA zeigten vier von sechs untersuchte Retinoblastomzelllinien.

Eine epigenetische Modulation der Genaktivität, wie sie für TSG oft beschrieben wird, war für FAM107A in der Linie RCC-1 nachweisbar. Andere untersuchte Zelllinien zeigten keine Induktion der FAM107A-mRNA-Expression nach Decitabin-beziehungsweise TSA-Behandlung. Ebenfalls war keine Modulation der Genexpression von FAM107A durch Behandlung von den Nierenkarzinomzelllinien RCC-1 und HTB-46 mit dem Zytostatikum Cisplatin nachweisbar.

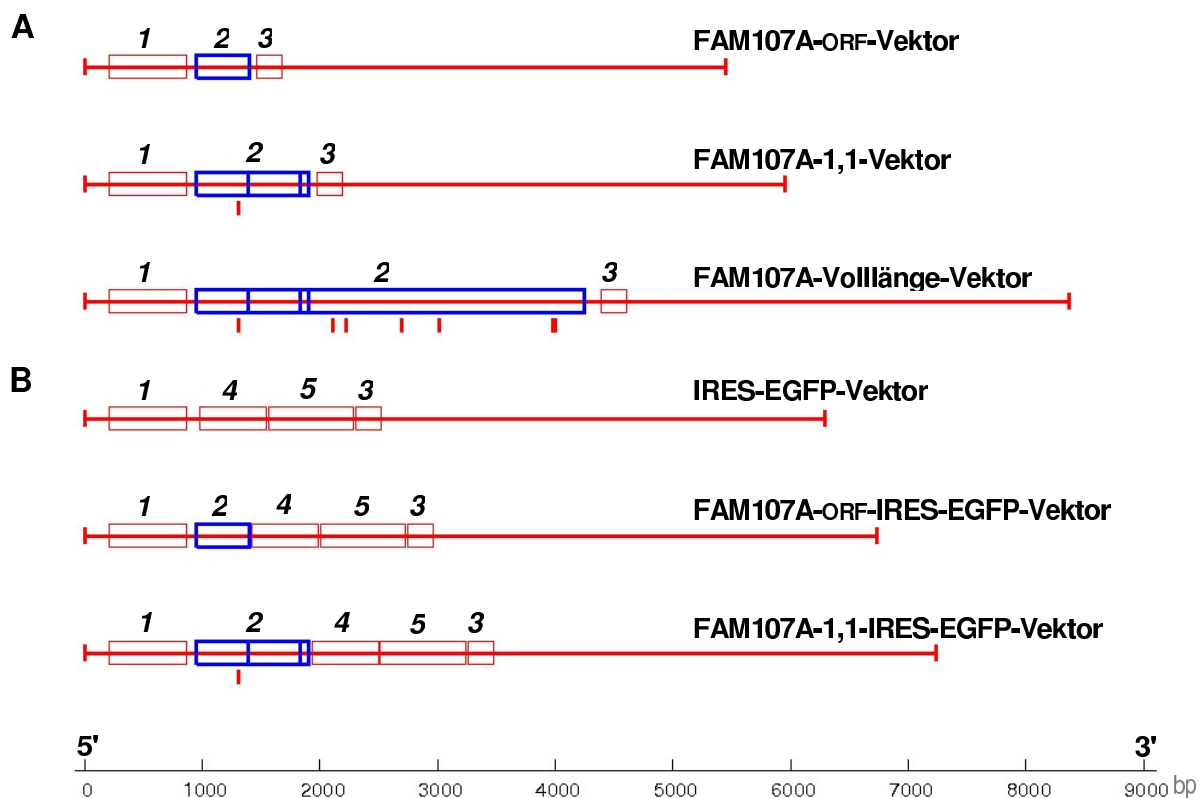
### 3.5 FAM107A ektopisch exprimierende Zelllinien

Um einen Einfluss der Expression von FAM107-ORF auf die Tumorigenität der Zelllinien RCC-1 und HTB-46 untersuchen zu können, wurden FAM107A-Vektoren konstruiert und diese Vektoren in RCC-1- und HTB-46-Zellen stabil transfiziert.

#### 3.5.1 Etablierung FAM107A ektopisch stabil exprimierender Zelllinien

##### 3.5.1.1 Konstruktion von FAM107A-cDNA-Vektoren

Für die ektopische Expression der FAM107A-cDNA wurden in der vorliegenden Arbeit Vektoren mit einem CMV-Promotor konstruiert, die das cDNA-Insert nach Transfektion konstitutiv exprimieren sollten (*Abb 34*).



**Abb 34: Schematische Darstellung der Vektoren zur Expression von FAM107A.** Das Vektorgrundgerüst ist in allen Fällen pCDNA3.1ZEO(+), dargestellt als rote Linie. [A] FAM107A-Vektoren ohne Markergen-Koexpression. Der FAM107A-ORF-Vektor enthält den offenen Leserahmen, der FAM107A-1,1-Vektor enthält 1,1 Kilobasen des 5'-Endes der cDNA, der FAM107A-VOLLLÄNGE-Vektor enthält die Volllänge-cDNA. [B] FAM107A-Vektoren zur Koexpression von EGFP über eine IRES und Kontrollvektoren. **1** CMV-Promotor, **2** FAM107A-ORF-cDNA beziehungsweise 1,1kB-cDNA beziehungsweise Volllänge-cDNA, **3** BGH-polyA-Signal, **4** IRES, **5** EGFP. Nukleotidaustausche in den Sequenzen im Vergleich zu der Referenzsequenz sind jeweils mit einem roten Strich markiert.

Die Sequenzierung des Inserts des FAM107A-1,1-Vektors zeigte in der ORF-Sequenz eine 100%ige Homologie mit den Referenzsequenzen NM\_007177 und NM\_001076778 (*Abb 58, 59*). Ein Basenaustausch von G nach A in der Basenpaarposition 341 lag 5' aufwärts des kodierenden Bereichs und wurde als unerheblich für das Proteinprodukt angesehen. Außerdem betraf dieser Basenaustausch nicht das putative Startcodon beziehungsweise die weiteren putativen Startcodons, die 5' von der ORF-Sequenz liegen. Die Sequenzierung mit Insert-flankierenden Primern verifizierte die Korrektheit der FAM107A-ORF-Sequenz des FAM107A-ORF-Vektors (*Abb 60*). Die Identität des Volllänge-FAM107A-cDNA-Fragmentes im FAM107A-Volllänge-Vektor wurde durch Sequenzieren vorläufig überprüft (keine Reproduktion, *Abb 61*). Der Abgleich der Sequenz des Volllänge-Vektors mit den Referenzsequenzen zeigte neben der 100%igen Homologie zu den beiden Referenzsequenzen im ORF-Bereich einzelne Nukleotidaustausche in der 5'- und der 3'-untranslatierten Region (*Abb 34*). Vor weiterem Gebrauch des Volllänge-Vektors sollte dieser daher weiter überprüft werden.

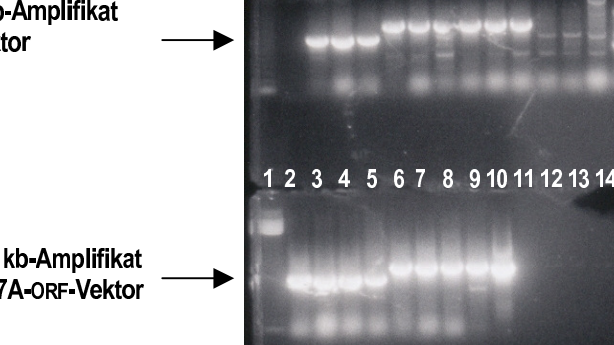
Die Sequenzierung des Inserts des Expressionsvektors pCDNA3.1ZEO(+)-FAM107A-ORF-IRES-EGFP bestätigte die Homologie der Sequenz des FAM107A-ORF-Inserts im Vektor mit den beiden Referenzsequenzen (*Abb 63*). In der Sequenz des Vektors pCDNA3.1ZEO(+)-FAM107A-1,1-IRES-EGFP wurde der Nukleotidaustausch des entsprechenden Expressionsvektors ohne IRES-EGFP-Sequenz detektiert, nämlich von G nach A (Basenpaarposition 341, NM\_007177 und NM\_001076778, *Abb 62*).

### **3.5.1.2 Etablierung FAM107A ektopisch stabil exprimierender Zelllinien**

Für die Analyse des Effektes der ektopischen Expression von FAM107A-ORF-mRNA in Kulturzellen wurden die beiden Nierenkarzinomzelllinien RCC-1 und HTB-46 stabil transfiziert. Nach zweiwöchiger Selektion mit 0,5mg/ml Zeocin wurden keine großen Unterschiede in der Anzahl gewachsener Kolonien pro Zelllinie beobachtet. Die Gelelektrophorese der PCR-Amplifikate zur Überprüfung der DNA-Qualität (PCR mit den Primern Chr3-58.035.418-/Chr3-58.035.874+ und Chr3-58.505.732-/Chr3-58.503.509+) ergab für alle Zelllinien die Banden der erwarteten Größen (Daten nicht gezeigt). Mit den vektorspezifischen Primern pcDNA3.1-1.275-/pcDNA3.1-213+ (*Tabellen 2.3, S.34, 8.7-8.8, S.151f.*) wurde ein Plasmidanteil amplifiziert, wodurch die Anwesenheit des Plasmids im Genom der Zelllinien bestätigt werden konnte (*Abb 35*). Die mit dem Leervektor beziehungsweise dem FAM107A-ORF-Vektor

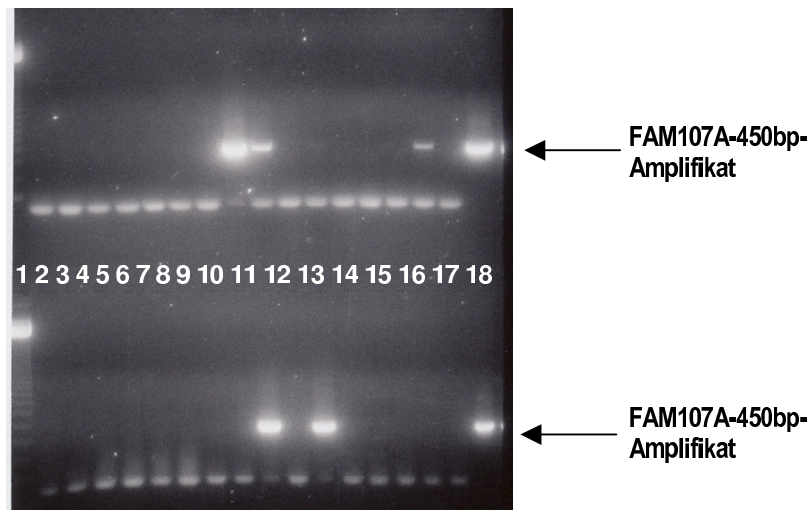
ca. 1 kb-Amplifikat  
Leervektor

ca. 1,5 kb-Amplifikat  
FAM107A-ORF-Vektor



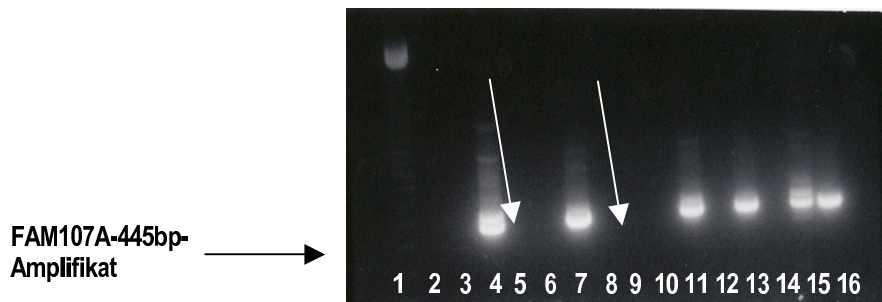
Bei Zellen der 3. Passage der transfizierten Zelllinien zeigte die Expressionsanalyse, welche der Zelllinien die FAM107-cDNA exprimierten (Abb 36). Die Transkripte wurden mittels RT-PCR nach RNA-Extraktion und cDNA-Synthese amplifiziert. Die Überprüfung der cDNA mit FLNB-RT-PCR erfolgte abweichend von dem sonst üblichen Protokoll in von der FAM107A-RT-PCR getrennten Ansätzen. Die gelelektrophoretische Analyse der Amplifikate der FAM107A-RT-PCR ergab drei deutliche Banden (Linien R03, R08, R012 von den sechs untersuchten #3,8,9,11,12,13 der RCC-1-ORF-Zelllinien), eine sehr schwache (Linie R09) und bei zwei Zelllinien fehlte die Gelbande und somit die Expression. Von den vier





**Abb 36: Expression von FAM107A-ORF-mRNA in stabil transfizierten Zelllinien.** RT-PCR-Produkte spezifisch für FAM107A-mRNA. Dargestellt sind jeweils die +/-RT-Proben. Spurenbelegung: Obere Reihe: 1: 123bp-Leiter; 2: Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O); 3–8: RCC-PCDNA3.1ZEO(+)#3,11,12; 9: R03, RT+; 10–17: R08,9,11,12; 18: Positiv-Template-FAM107A; Untere Reihe: 1: 123bp-Leiter; 2–3: R013; 4–9: HTB-46-PCDNA3.1ZEO(+)#7,8,9; 10–17: H08,11,12,14; 18: Positiv-Template-FAM107A.

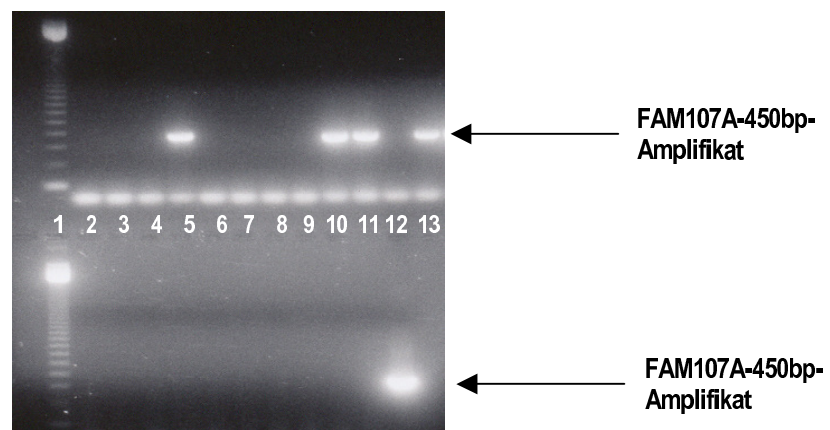
untersuchten Linien #8,11,12,14 der HTB-46-ORF-Zelllinien wiesen zwei (Linien H08 und H011) deutliche Gelbanden in der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte auf und die anderen beiden keine. In den mit dem Leervektor transfizierten Linien und in den nativen Zelllinien war keine Expression von FAM107A festzustellen. Deshalb waren diese Zelllinien, abweichend von vorher durchgeführten FAM107A-mRNA-Expressionsanalysen, als nicht-FAM107A-mRNA-exprimierend einzustufen. Da mittels des gewählten Primerpaares nicht zwischen nativem und transfizierten FAM107A-Transkript unterschieden werden konnte, wurden an den sechs FAM107A-ORF-mRNA exprimierenden Zelllinien mit dem Primerpaar FAM107A-458+/ FAM107A-1.262- (Tabellen 2.3, S.34, 8.7-8.8, S.151f.) eine weitere RT-PCR durchgeführt. Der Primer FAM107A-1.262- lagert sich 3' außerhalb des ORF-Bereiches an und kann somit nicht das FAM107A-ORF-Insert erfassen. Die anschließende Gelelektrophorese wies durch die Bande des Amplifikats von ca. 800bp (erwartet 809bp) drei transfizierte Zelllinien nach, die eine schwache Expression des zellulären FAM107A-Transkriptes zeigten. Durch die Reamplifizierung mit dem Primerpaar FAM107A-513+/FAM107A-957- (Tabellen 2.3, S.34, 8.7-8.8, S.151f.) wurden die zwei Zelllinien R08 und R012 detektiert. Da in diesen beiden Linien keine Amplifikationsprodukte sowohl in der zuerst durchgeführten RT-PCR als auch in der Reamplifikation nachgewiesen wurden, ließ sich die FAM107A-ORF-Expression nur auf das transfizierte Plasmid zurückführen (Abb 37).



**Abb 37: Reamplifikation spezifischer FAM107A-cDNA.** RT-PCR-Produkte spezifisch für die exogene Expression von FAM107A-mRNA. Die Pfeile weisen auf die Zelllinien mit nur endogener FAM107A-mRNA-Expression hin. Spurenbelegung: Obere Reihe: 1: 123bp-Leiter; 2: Negativkontrolle ( $H_2O$ ); 3: Negativkontrolle ( $H_2O$ , Reamplifikation); 4: R03 +RT; 5/6: R08 +/-RT; 7/8: R09 +/-RT; 9/10: R012 +/-RT; 11/12: H08 +/-RT; 13/14: H011 +/-RT; 15: pCDNA3.1ZEO(+)-FAM107A-1,1#97 (Reamplifikation); 16: pCDNA3.1ZEO(+)-FAM107A-1,1#97 (1,8%iges Agarosegel nach einer Laufzeit von 1h45min bei 110Volt).

### 3.5.1.3 Stabilität der FAM107A ektopisch exprimierenden Zelllinien

Zur weiteren Analyse der stabil transfizierten Zelllinien wurden zunächst die Linien R03 und R012 als Beispiel für überexprimierende, nämlich die Linie R03, sowie für exprimierende Zellen, die Linie R012, verwandt, als auch die Linien H08 und H011 als überexprimierende Zellen. Zur Überprüfung der Stabilität der Zelllinien wurde regelmäßig in größeren Abständen die Expression von FAM107A-ORF-mRNA mittels RT-PCR analysiert (Abb 38). Nach 38 Passagen zeigte die Linie R03 weiterhin Expression von FAM107A-ORF-mRNA, dagegen die Linie R012 nach neun Passagen keine mehr. Die Linien H08 und H011 exprimierten nach 38 Passagen FAM107-ORF-mRNA. Die Linien R03, H08 und H011 wurden als dauerhaft stabil FAM107A-exprimierend angesehen.



**Abb 38: FAM107A-Expressionsanalyse mit dem Primerpaar FAM107A-458+/FAM107A-897- in den stabil transfizierten Zelllinien RCC-1 und HTB-46.** RT-PCR-Produkte spezifisch für FAM107A-mRNA. Spurenbelegung: Obere Reihe: RT(+)-Proben der RT-PCR: 1: 123bp-Leiter; 2: Negativkontrolle ( $H_2O$ ); 3: RCC-1; 4: RCC-pCDNA3.1ZEO(+); 5: R03; 6: R011; 7: R012; 8: HTB-46; 9: HTB-46-pCDNA3.1ZEO(+); 10: H08; 11: H011; 12: H012; 13: Positiv-Template-FAM107A; Untere Reihe: RT(-)-Proben der RT-PCR: 1: 123bp-Leiter; 2: RCC-1; 3: RCC-pCDNA3.1ZEO(+); 4: R03; 5: R011; 6: R012; 7: HTB-46; 8: HTB-V; 9: H08; 10: H011; 11: H012; 12: Positiv-Template-FAM107A.

### 3.5.1.4 Expression des Leervektors in den stabil transfizierten Zelllinien

Neben dem Nachweis der Expression von FAM107A-cDNA in den stabil transfizierten Zelllinien wurde überprüft, ob der Expressionsvektor ohne Insert zu einer Expression einer cDNA führt.

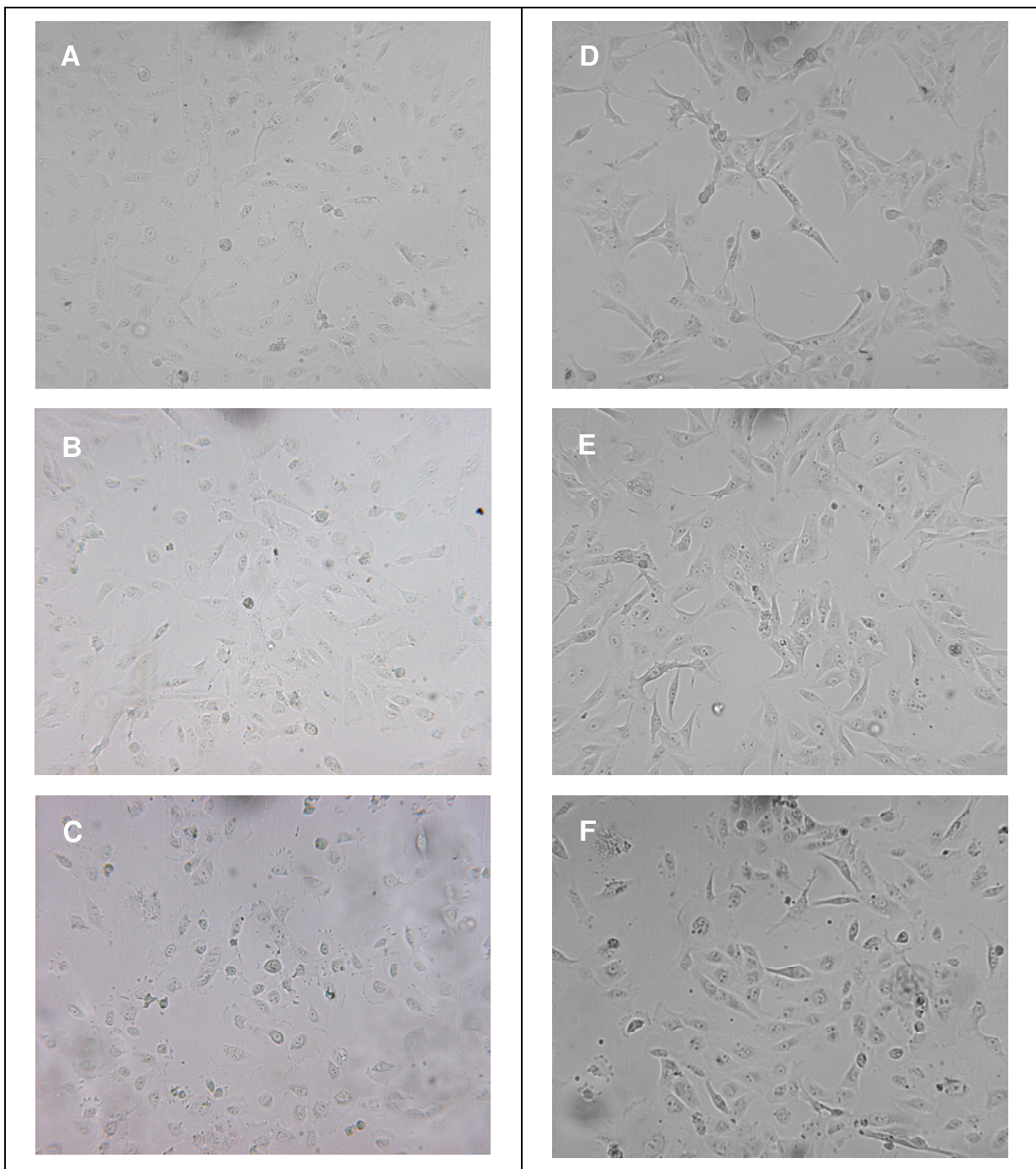
Das Primerpaar pcDNA3.1-839+/pcDNA3.1-1.031- (Tabellen 2.3, S.34, 8.7-8.8, S.151f.) umspannt den putativen Transkriptionsstart und die EcoR1-Schnittstellen, so dass in den mit FAM107A-ORF stabil transfizierten Klonen das ORF-Fragment nachgewiesen werden konnte. In den HTB-46-pcDNA3.1ZEO(+)-Zellen wurde ein Transkript von ca. 190bp amplifiziert (Abb 39). Dieses Transkript wies eine cDNA in der Linie HTB-46-pcDNA3.1ZEO(+) nach. In den RCC-1-Zellen war es jedoch nicht nachweisbar. Fraglich ist, ob das gebildete Transkript die Zellen beeinflusst.



**Abb 39: RT-PCR mit dem Primerpaar pcDNA3.1Zeo(+)-839+/pcDNA3.1Zeo(+)-1.031-.** RT-PCR-Produkte, amplifiziert mit spezifischem Transkriptionsstartprimer. Spurenbelegung: 1: 100bp-Leiter; 2: Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O); 3/4: RCC-1 +/-RT; 5/6: RCC-1-pcDNA3.1ZEO(+) +/-RT; 7/8: R03 +/-RT; 9/10: HTB-46 +/-RT; 11/12: HTB-46-pcDNA3.1ZEO(+) +/-RT; 13/14: H08 +/-RT; 15: Positiv-Template-FAM107A.

### 3.5.1.5 Morphologie FAM107A ektopisch exprimierender Zelllinien

Zur Charakterisierung der Zelllinien wurden als Kontrollen jeweils die native Zelllinie und die mit Leervektor transfizierte Zelllinie in den Experimenten mitgeführt (Bezeichnung RCC-V bzw. HTB-V für Vektor-transfizierte Zellen). Zunächst wurden die nativen Zellen mit den mit dem Leervektor beziehungsweise dem FAM107A-ORF-Vektor transfizierten Zellen verglichen. Morphologisch ließen sich die mit Leervektor und mit FAM107A-ORF transfizierten Zellen nicht von den nativen Zellen unterscheiden (Abb 40).



**Abb 40: Morphologie der stabil transfizierten Zelllinien.** Die transfizierten Zellen zeigten gegenüber den nativen keine morphologischen Veränderungen: [A] RCC-1 p67; [B] RCC-V p70; [C] R03 p71; [D] HTB-46 p63; [E] HTB-V p73; [F] H08 p35 (Aufnahme 24h nach Aussaat, exemplarische Darstellung, Objektiv-Vergrößerung 40X).

### 3.5.1.6 Karyogramme *FAM107A* ektopisch exprimierender Zelllinien

Bei den RCC-1-Zellen wurden sieben bis zehn Metaphasen nach Giemsa-Färbung ausgewertet (Abb 41). Alle Zellen zeigten einen aberranten, hypo- bis hypertriploiden Chromosomensatz. Bei den HTB-46-Zellen wurden sieben bis zwölf Metaphasen ausgewertet. Die nativen HTB-46-Zellen zeigten einen aberranten, hyperdiploiden bis



**Abb 41: Karyogramme der stabil transfizierten Zelllinien.** Alle Zellen zeigten einen aberranten Karyotyp. Beispielhaft sind hier einzelne Karyogramme dargestellt: [A] RCC-1; [B] RCC-V; [C] R03; [D] HTB-46; [E] HTB-V; [F] H08.

hypotriploiden Chromosomensatz, die mit Leervektor transfizierten HTB-46-Zellen einen hypotriploiden bis hypopentaploiden und die mit FAM107A-ORF-Vektor transfizierten HTB-46-Zellen einen hypotriploiden bis hypertriploiden. Die einzelnen Metaphasen einer Zelllinie zeigten eine voneinander abweichende Gesamtchromosomenanzahl. Chromosomale Marker waren sowohl bei den RCC-1-Zellen als auch bei den HTB-46-Zellen schwer festzustellen. Insgesamt zeigten die Zellen heterogene Karyotypen (*Tab 8.11*, S.154), obwohl sie ursprünglich aus derselben Population stammten.

### **3.5.2 Analysen zur Proliferation FAM107A ektopisch exprimierender Zelllinien**

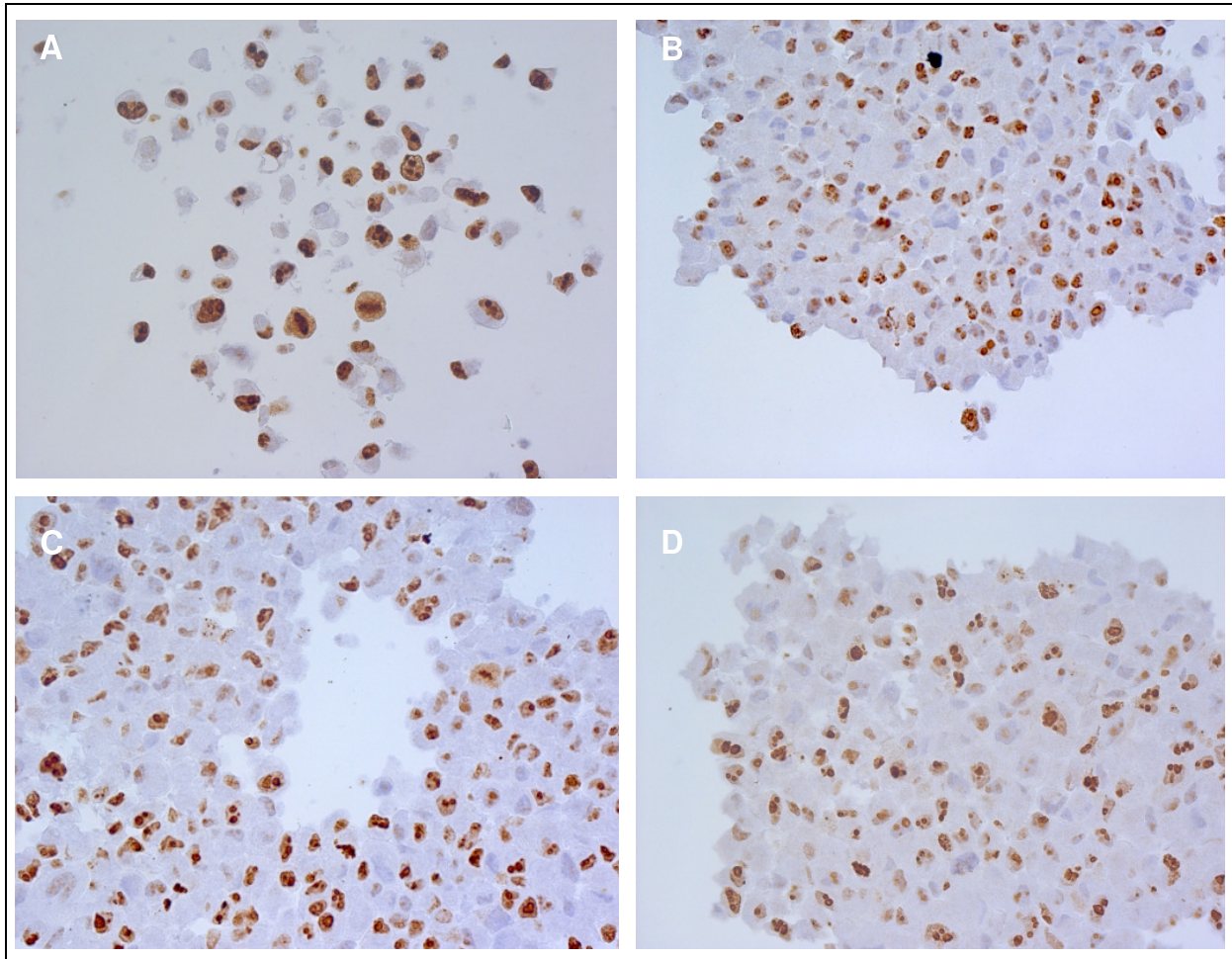
Einen Schwerpunkt bei funktionalen Analysen von potenziellen TSG bilden Methoden zur Messung der Proliferation von Zellen. Dabei können verschiedene Aspekte der Proliferation durch unterschiedliche Methoden betrachtet werden wie die Ki67-Expression durch immunzytochemische und durchflusszytometrische Analysen, die DNA-Syntheserate durch Thymidineinbau und die Zunahme der Zellzahl durch die Aufnahme von Zellwachstumskurven.

#### ***3.5.2.1 Proliferationsmessung mittels immunzytochemischer Analyse der Expression von Ki-67/Mib1-Antigen in den nativen und stabil transfizierten HTB-46-Zellen***

Die stabil mit dem Vektorgrundgerüst beziehungsweise mit dem FAM107A-ORF-Vektor transfizierten und die nativen HTB-46-Zellen wurden mittels Immunzytochemie auf die Expression des Proliferationsmarkers Ki67 hin untersucht (*Abb 42*). Es wurden vier Präparate mit insgesamt ca. 3.500 Zellen ausgezählt. Unterschieden wurden negative, intermediär angefärbte und stark positive Signale anhand der Braunfärbung der Zellkerne. Die Auswertung der immunzytochemischen Ergebnisse erfolgte durch dreimaliges Auszählen der Zellen durch drei unabhängige Untersucher. Dabei wurde eine Interobservervariabilität festgestellt, die bis zu dreimal so hoch wie die Intraobservervariabilität war. Die Abweichungen waren bei den Ki67-positiven Zellen geringer, da diese Zellen durch die bräunliche Färbung eindeutig zählbar waren. Besonders große Abweichungen fanden sich in der Anzahl der gezählten negativen Zellen, da z.T. die Zellmembranen kaum erkennbar waren und somit die einzelnen Zellen schlecht unterscheidbar waren. Insgesamt war die Gesamtzellzahl bei den transfizierten Zellen geringer (bis zu 50% weniger im



Vergleich zu den nativen). Signifikante Unterschiede zwischen den mit dem Vektorgrundgerüst beziehungsweise dem FAM107A-ORF-Vektor transfizierten Zellen bezüglich des Anteils Ki67-positiver Zellen gab es nicht. Somit ließ sich anhand der immunzytochemischen Analyse der Ki67-Expression keinen Hinweis auf einen Einfluss der Expression von FAM107A-ORF auf die Proliferation erhalten.



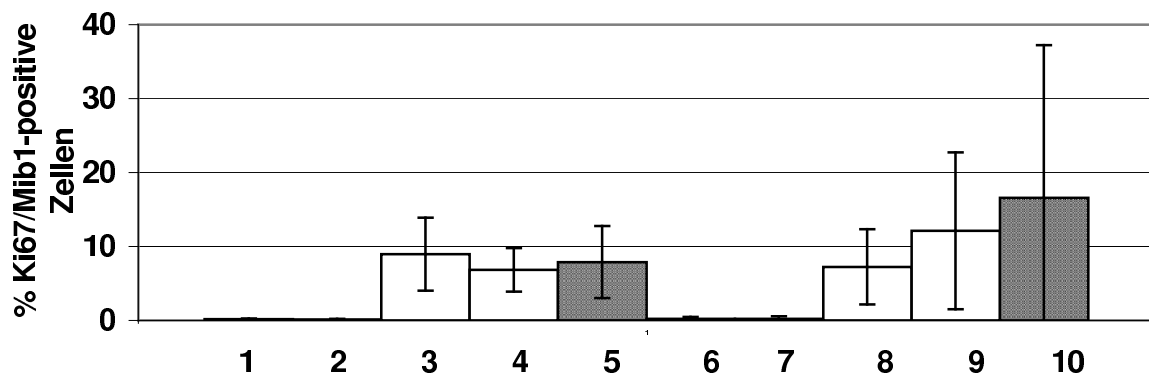
**Abb 42: Ki67-Immunzytochemische Analyse der stabil transfizierten HTB-46-Zellen.** Die nativen Zellen zeigten im Vergleich zu den transfizierten Zellen viele Einzelzellen ohne Verbund. Die Ki67-positiven Zellen wurden durch eine Braunfärbung der Zellkerne identifiziert. Kräftig braungefärbte Zellen wurden als positive, schwach braungefärbte als intermediär angefärbte Ki67-positive Zellen gewertet. [A] HTB-46-Zellen; [B] HTB-V-Zellen; [C] H08-Zellen; [D] H011-Zellen (n=1).

### **3.5.2.2 Proliferationsmessung mittels durchflusszytometrischer Analyse der Expression von Ki-67/Mib1-Antigen in den stabil transfizierten Zelllinien**

Um die immunzytochemische Analyse der Ki-67-Expression zu objektivieren, wurde die Ki67-Expression durchflusszytometrisch in den transfizierten HTB-46- und zusätzlich in den RCC-1-Zellen untersucht.

Die durchflusszytometrische Analyse der Ki67-gefärbten stabilen Zelllinien zeigte eine reduzierte Ki67-Expression der mit Leervektor und mit dem FAM107A-ORF-Vektor transfizierten RCC-1-Zellen. Bei den HTB-46-Zellen wiesen beide

Transfektanten eine verstärkte Ki67-Expression auf, wobei die Linie H08 Ki67 noch stärker exprimiert als die Linie HTB-V. Der Anteil Ki67-positiver Zellen in den Ansätzen der diversen Versuche war sehr unterschiedlich (z.B. von 3,6 bis 13,8% Ki67-positive Zellen für die nativen RCC-1-Zellen), so dass hinsichtlich der Ki-67-Expression keine statistischen Tests durchgeführt wurden (*Abb 43*). Zusammengefasst war kein Einfluss der Expression von FAM107A auf die Expression von Ki67 in den untersuchten Zellsystemen feststellbar.



**Abb 43: Durchflusszytometrische Analyse der Ki67-Expression in den stabil transfizierten RCC-1- und HTB-46-Zellen.** Dargestellt ist der prozentuale Anteil Ki67-positiver Zellen. Probenverteilung: 1/6: Negativkontrolle, d.h. ungefärbte RCC-1- bzw. HTB-46-Zellen; 2/7: RCC-1- bzw. HTB-46-Zellen, mit Isotypkontrolle Maus Ig G1 Immunglobulin gefärbte Zellen; 3-10: Ki67-gefärbte Zellen, wobei: 3: RCC-1-Zellen; 4: RCC-V-Zellen; 5: R03-Zellen; 8: HTB-46-Zellen; 9: HTB-V-Zellen; 10: H08-Zellen (MW ± STABW, n=3).

### 3.5.2.3 Zellzyklusanalyse

Nachdem sich anhand des Proliferationsmarkers Ki67 keine substanziellen Unterschiede zwischen den nativen und transfizierten Zellen zeigen ließen, wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse der DNA-Gehalt der Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen quantifiziert (*Tab 3.3*, S.90).

Die mit FAM107A-ORF-Vektor transfizierten Zellen zeigten bei den RCC-1-Zellen einen verminderten Anteil an Zellen in der S-Phase, dagegen einen geringfügig erhöhten Anteil an Zellen in der G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Phase. Bei den HTB-46-Zellen war der Anteil an Zellen in der S-Phase in den mit Leervektor und mit dem FAM107A-ORF-Vektor transfizierten Zellen im Vergleich zu den nativen Zellen leicht erhöht. Die Anzahl apoptotischer Zellen (SubG<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>) war bei den unterschiedlichen RCC-1-Zelllinien gleich, bei den HTB-46-Zelllinien verdoppelte sie sich durchschnittlich von ca. 102 auf ca. 193 Zellen in den mit den FAM107A-ORF-Vektor stabil transfizierten Zelllinien in 2 von 3 Versuchen. Der Anteil an Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen in den einzelnen Versuchen war unterschiedlich. Die ektopische Expression von



FAM107A-ORF in stabil transfizierten Zelllinien führte bei den RCC-1-Zellen nicht zu wesentlichen Unterschieden der Verteilung der Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen. Bei den HTB-46-Zellen wies die Zunahme der apoptotischen Zellen in den mit dem FAM107A-ORF-Vektor transfizierten Zellen möglicherweise auf eine tumorsuppressive Wirkung hin.

**Tab 3.3: Zellzyklusanalyse FAM107A-ORF ektopisch exprimierender Zellen.** Tabellarische Darstellung der MW und STABW der Cylchredanalyse von je 3 durchflusszytometrischen Zellzyklusanalysen.

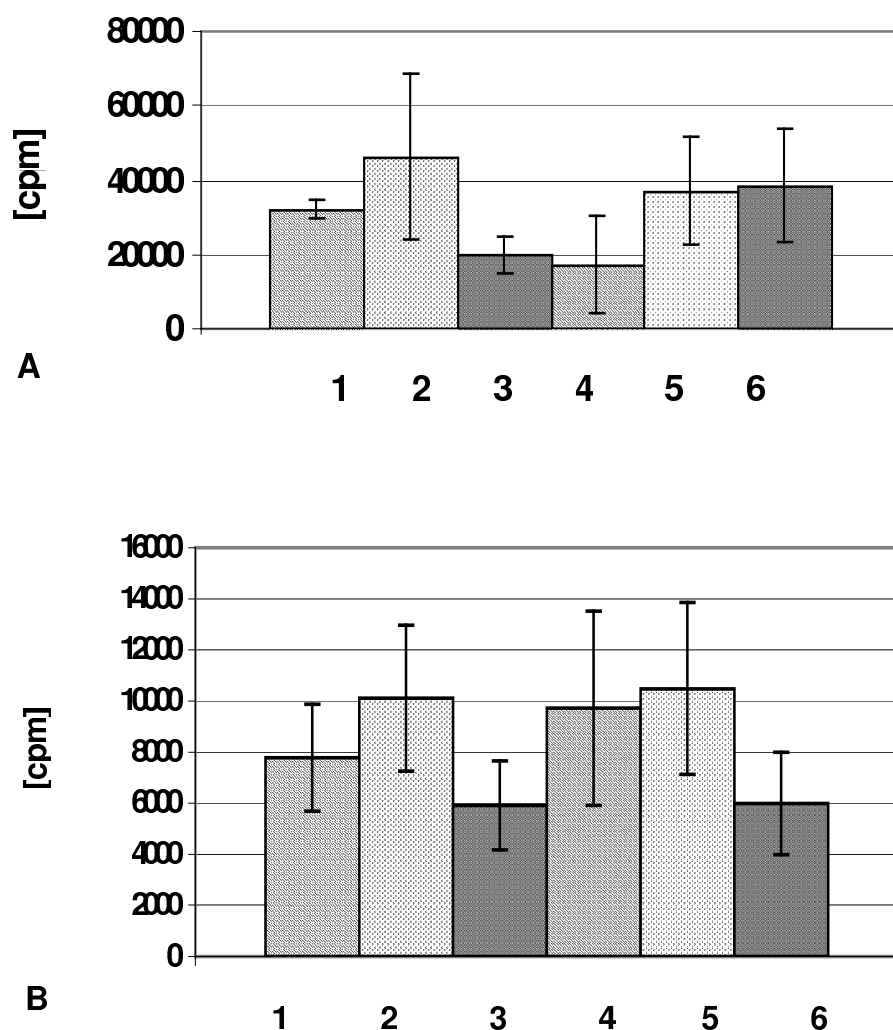
Zelllinien	MW G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> - Phase [%]	STABW G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> - Phase	MW S- Phase [%]	STABW S- Phase	MW G <sub>2</sub> /M- Phase [%]	STABW G <sub>2</sub> /M- Phase	MW Sub G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> - Phase [Zellzahl]	STABW SubG <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> - Phase
RCC-1	25,7	2,3	55,7	2,10	18,6	1,1	32	7
RCC-V	21,4	3,4	55,8	3,9	22,8	3,6	29	7,8
R03	27,6	3,7	50,9	2,7	21,5	3,2	30,7	9,3
HTB-46	30,8	1,6	44,1	2,6	25,1	3,4	101,7	24,5
HTB-V	26,5	2,9	48,8	7,3	24,8	5,8	96,3	36,1
H08	25,6	4,2	48,3	7,6	26,1	3,4	193,3	107,3

### 3.5.2.4 Messung der DNA-Synthese durch <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau

Da die Zellzyklusanalyse keine statistisch auswertbaren Unterschiede zeigte, ein Einfluss von FAM107A aber auf die Zellproliferation in transient transfizierten Zellen schon beobachtet worden war (Wang, 2000; Zhao, 2007), wurde mittels radioaktiv markiertem <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau, die DNA-Syntheserate in den Linien gemessen. Tumorzellen zeigen im Vergleich zu gesunden Zellen eine relativ hohe DNA-Syntheserate. Durch die Transfektion eines potenziellen TSG in Tumorzellen würde man eine verminderte DNA-Syntheserate erwarten.

Bezüglich der DNA-Einbaurate ließ sich ein Unterschied zwischen den Zelllinien feststellen. Bei den RCC-1-Zellen war bei der mit dem Leervektor transfizierten Zelllinie die Einbaurate gegenüber den nativen erhöht, während sie bei der mit dem FAM107A-ORF-Vektor transfizierten Zelllinie erniedrigt war. Auch bei den HTB-46-Zellen zeigte die mit dem Leervektor transfizierten Zelllinie gegenüber den nativen Zellen eine erhöhte Einbaurate. Die mit dem FAM107A-ORF-Vektor transfizierte Zelllinie jedoch wies im Versuch 1 (Exp.1) eine gegenüber der Parentallinie erhöhte Einbaurate auf. In Versuch 2 (Exp.2) aber, der abweichend von Exp.1 (drei Ansätze) mit sechs (voneinander abhängigen, da aus einer Passage) Ansätzen pro Zelllinie durchgeführt wurde, fand sich eine gegenüber der Parentallinie erniedrigte Einbaurate (Abb 44). Insgesamt waren die absoluten Zahlen, gemessen in Einbauraten als gezählte Impulse pro Minute (Counts per minute, cpm), bei beiden

Versuchen sehr divergierend (Exp.1, cpm (MW der untersuchten Linien)=32.792; Exp.2, cpm (MW)=8330), weshalb sie als Einzelversuche dargestellt werden. Aus diesem Grund und wegen der nur zweimaligen Gesamtdurchführung wurde kein statistischer Test durchgeführt. Insgesamt ließ sich aber die Tendenz feststellen, dass in Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert worden waren, eine gegenüber der jeweiligen Parentallinie verstärkte Einbaurate von  $^3\text{H}$ -Thymidin auffindbar war. In Zellen, die mit dem FAM107A-ORF-Vektor transfiziert worden waren, zeigten sich in Abhängigkeit von der Zelllinie eine geringere Einbaurate (RCC-1-Zellen) beziehungsweise nicht eindeutige Tendenzen (HTB-46-Zellen). Das Testsystem der RCC-1-Zellen gab Hinweise für eine eventuelle Beeinflussung der DNA-Synthese durch die Transfektion mit dem FAM107A-ORF-Vektor.



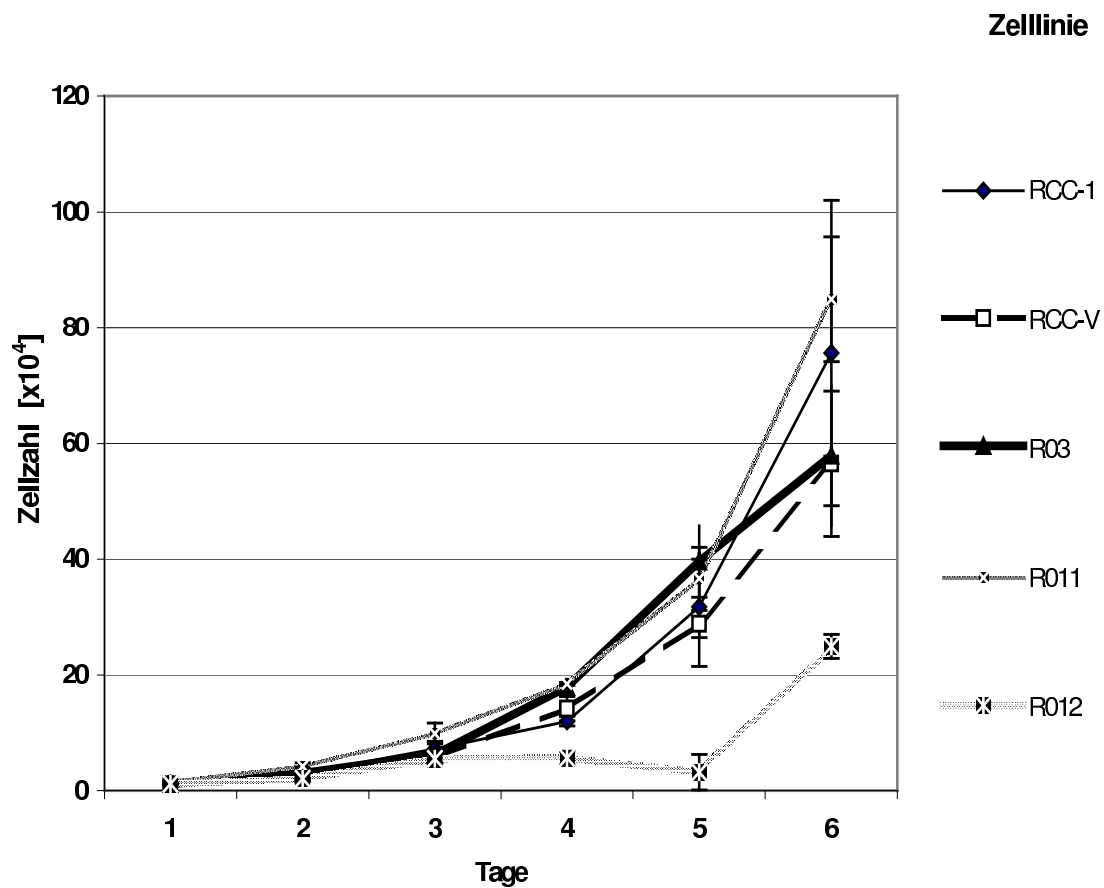
**Abb 44: Messung des  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbaus.** Die  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbaurate zwischen Versuch 1 und 2 war sehr divergierend. [A] Exp.1: MW  $\pm$  STABW, n=3, [B] Exp.2: MW  $\pm$  STABW, n=6: 1: RCC-1-Zellen; 2: RCC-V-Zellen; 3: R03-Zellen; 4: HTB-46-Zellen; 5: HTB-V-Zellen; 6: H08-Zellen.

### **3.5.2.5 Proliferationskinetik der stabil transfizierten Zelllinien**

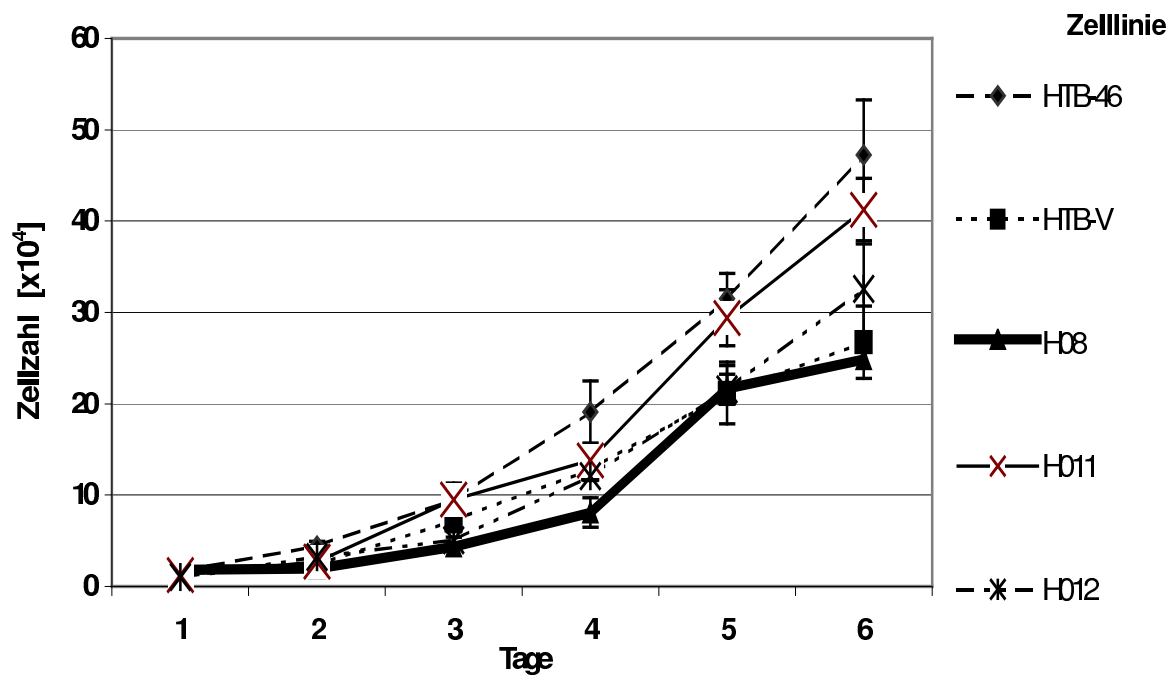
Sowohl die Analyse der DNA-Syntheserate mittels  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbaus als auch die Expression des Proliferationsmarkers Ki67 zeigten keine substanziellen Unterschiede zwischen den nativen und den stabil transfizierten Zelllinien. Deshalb wurden Proliferationskinetiken erstellt, indem die Proliferation der Zellen anhand der tatsächlichen Zellzahl in den Kulturen gemessen wurde.

Das Proliferationsverhalten wurde durch Zählen der Zellen der stabil transfizierten Zelllinien ausgehend von einer Zellzahl von  $1 \times 10^4$  pro Untersuchungsgefäß (RCC-1-Zellen) beziehungsweise  $2 \times 10^4$  (HTB-46-Zellen) über einen Zeitraum von sechs Tagen gemessen. Sowohl die nativen RCC-1-Zellen als auch die stabil mit dem Leervektor beziehungsweise mit dem FAM107A-ORF-Vektor transfizierten Zelllinien zeigten ein vergleichbares Proliferationsverhalten (*Abb 45*). R03-Zellen exprimierten FAM107A-mRNA und zeigten eine vergleichbare Proliferationskinetik wie die nativen und die mit Leervektor transfizierten Zellen. Die Linie R011 exprimierte FAM107A-mRNA nicht und stellte somit eine zusätzliche Negativkontrolle dar. Eine Ausnahme bildete die Linie R012. Sie exprimierte in frühen Passagen FAM107A-mRNA, zeigte aber in den untersuchten späteren Passagen keine FAM107A-mRNA-Expression mehr. Im dargestellten Einzelversuch zeigte sie eine geringere Proliferationsrate, was sich aber in den Versuchswiederholungen nicht bestätigen ließ (*Abb 47*).

Auch bei den nativen HTB-46-Zellen und ihren Transfektanten wurden keine Proliferationsunterschiede detektiert (*Abb 46*). Die Linie H08, die FAM107A-mRNA exprimierte, zeigte geringfügig verminderte Zellzahlen gegenüber der nativen und der mit Leervektor transfizierten Zelllinie. Die Linie H012, die FAM107A-mRNA nicht exprimierte, wurde als weitere Negativkontrolle geführt. Bei der Linie H011, die FAM107A-mRNA exprimierte, wurden ähnliche Zellzahlen gezählt wie bei den Kontrollzellen.

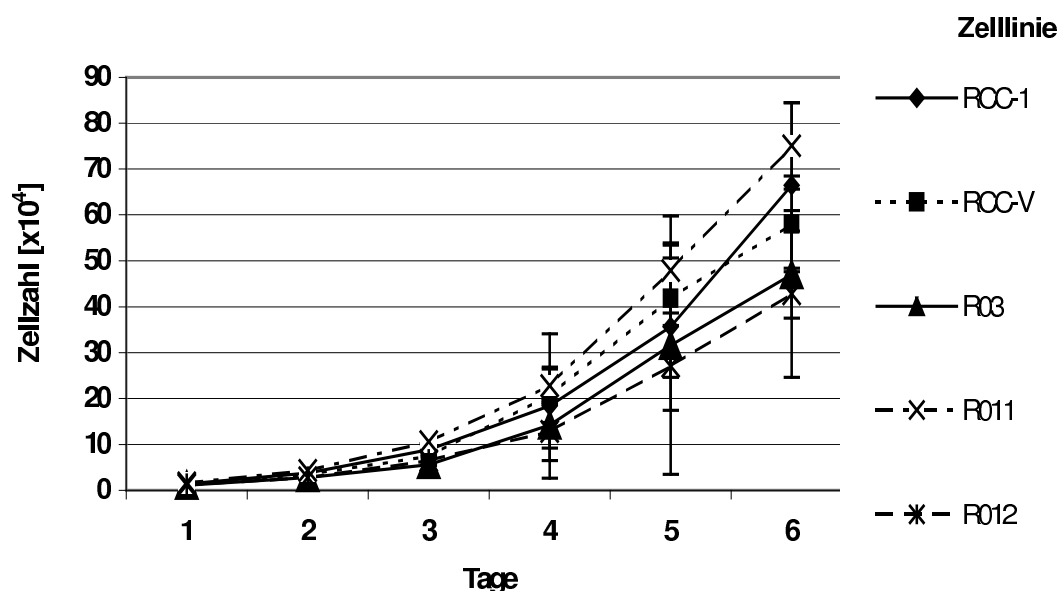


**Abb 45: Proliferationskinetik der nativen und stabil transfizierten RCC-1-Zellen durch Zellzahlbestimmung.** Die Abbildung stellt die MW eines von drei durchgeführten Versuchen dar; MW  $\pm$  STABW, n=3.



**Abb 46: Proliferationskinetik der nativen und stabil transfizierten HTB-46-Zellen durch Zellzahlbestimmung.** Die Abbildung stellt die MW der Zellzahlen eines von drei durchgeführten Versuchen dar; MW  $\pm$  STABW, n=3.

Die Triplikate eines Versuches wiesen große Standardabweichungen auf (z.B. für RCC-1: Tag 1: STABW=0,18; Tag 6: STABW=26,3), obwohl sie aus derselben Passage und aus demselben Ansatz pipettiert wurden. Die zweifache Wiederholung des Versuches zeigte unterschiedliche Zellzahlen sowohl innerhalb eines Versuches als auch zwischen den einzelnen Versuchen (Abb 47). Aufgrund der hohen Standardabweichungen ließ sich nicht beurteilen, ob nach Transfektion des FAM107A-ORF-Vektors die Proliferation in den untersuchten Zellsystemen moduliert wurde. Als Tendenz ließ sich aber in den mit dem FAM107A-ORF-Vektor transfizierten RCC-1-Zellen eine geringere Proliferationsrate als in den nativen Zellen feststellen.



**Abb 47: Proliferationskinetik der nativen und stabil transfizierten RCC-1-Zellen durch Zellzahlbestimmung.** Darstellung der MW der drei durchgeführten, voneinander unabhängigen Versuche; MW  $\pm$  STABW, n=3.

### 3.5.3 Analyse von Tumorigenitätsmarkern in FAM107A-ORF ektopisch exprimierenden Zelllinien

Die Proliferationsanalysen gaben keine eindeutigen Hinweise auf eine Beeinflussung der untersuchten Zellkulturzellen durch die ektopische Expression von FAM107A-ORF. Um weitergehende Daten zu erhalten, die Aufschluss über eine mögliche TSG-Aktivität des FAM107A-ORF-Vektors in Zellkulturzellen geben, wurden diverse Tumorigenitätsmarker analysiert.

### **3.5.3.1 Wachstum in Weichagarmedium**

Einen Hinweis auf die Tumorigenität maligner Zellen kann, wie schon erwähnt, ihre Fähigkeit geben, in halbfestem Medium kontaktunabhängig zu wachsen.

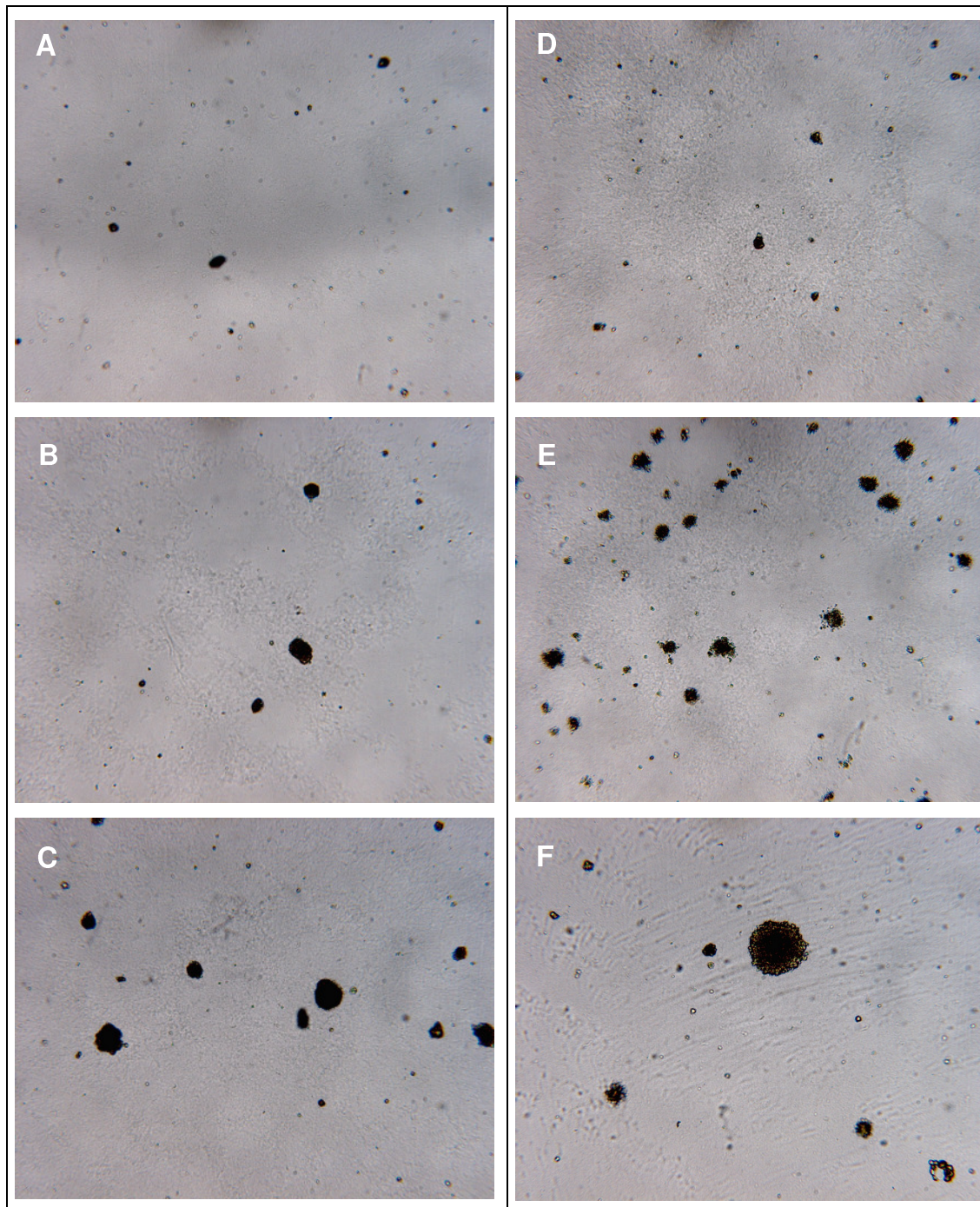
Um festzustellen, ob die ektopische Expression von FAM107A-ORF einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der untersuchten Zellen in Weichagar hatte, wurden die Zellen im halbfestem Medium ausgesät und das Wachstum von Kolonien durch Auszählen nach zwei bis drei Wochen überprüft. Die ersten beiden Versuche wurden mit einer Ausgangszellzahl von  $1 \times 10^4$  Zellen pro Ansatz durchgeführt. Ausgesät wurden die RCC-1-Zellen, die mit Leervektor transfizierten RCC-V-Zellen und R011-Zellen als nicht FAM107A-ORF-exprimierende Zellen. Positive, FAM107A-ORF-exprimierende Zellen waren R03, H08 und H011. Als Kontrolle für die HTB-46-Transfektanten wurden die nativen HTB-46-Zellen, die HTB-V- und die H012-Zellen ausgesät. Der Versuch wie auch seine Wiederholung wiesen sowohl große Standardabweichungen zwischen den drei Triplikaten innerhalb des Versuches als auch zwischen den beiden Versuchen auf (RCC-1, Exp.1: STABW=88; Exp.2: STABW= 9,3; *Tab 3.4*, S.96). In beiden Versuchen zeigte sich in den mit Leervektor transfizierten RCC-1- und HTB-46-Zellen ein vermehrtes Wachstum von Zellkolonien gegenüber den nativen Zellen. Die mit FAM107A-ORF-Vektor transfizierten Zellen wiesen ein reduziertes Wachstum von Kolonien im Vergleich zu den mit Leervektor transfizierten Zellen auf. Das Verhältnis der Anzahl der Kolonien im Vergleich zu den nativen Zellen war unterschiedlich: vergleichbar (H08, Exp.1), vermindert (um ~60% bei R03, Exp.1; um ~30% bei H08 und um ~22% bei H011, Exp.2) und vermehrt ( um das ~10fache im Vergleich zu den nativen Zellen bei R03, Exp.2; um das ~6fache bei H011, Exp.1; *Tab 3.4*, S.96). Dieses Ergebnis ergab also keine eindeutige, vielmehr eine widersprüchliche Aussage. Die zusätzlichen drei Zelllinien, die in der Expressionsanalyse FAM107A-ORF-negativ waren, zeigten in beiden Versuchen widersprüchliche Ergebnisse. Wegen der Widersprüche und weil die Anzahl der gewachsenen Kolonien in beiden Versuchen sehr divergierte, wurden zwei weitere Experimente angesetzt.

**Tab 3.4: Anzahl gewachsener Kolonien in Weichagarmedium, Exp.1 und 2.** Das Ergebnis der Proliferationsstudien der Zellen in Weichagar in den unterschiedlichen Experimenten war widersprüchlich.

	Experiment 1					Experiment 2				
	Probe1	Probe2	Probe3	MW	STABW	Probe1	Probe2	Probe3	MW	STABW
<b>RCC-1</b>	197	342	356	<b>298,3</b>	<b>88,0</b>	18	1	3	<b>7,3</b>	<b>9,3</b>
<b>RCC-V</b>	613	645	648	<b>635,3</b>	<b>19,4</b>	40	38	214	<b>97,3</b>	<b>101</b>
<b>R03</b>	153	100	112	<b>121,7</b>	<b>27,8</b>	73	3	163	<b>79,7</b>	<b>80,2</b>
<b>R011</b>	484	451	440	<b>458,3</b>	<b>22,9</b>	58	58	107	<b>74,3</b>	<b>28,3</b>
<b>R012</b>	121	143	152	<b>138,7</b>	<b>16,0</b>	38	36	2	<b>25,3</b>	<b>20,2</b>
<b>HTB-46</b>	4	8	23	<b>11,7</b>	<b>10,0</b>	332	309	239	<b>293,3</b>	<b>48,4</b>
<b>HTB-V</b>	204	277	312	<b>264,3</b>	<b>55,1</b>	612	1011	1247	<b>956,7</b>	<b>321</b>
<b>H08</b>	24	7	5	<b>12</b>	<b>10,4</b>	372	95	131	<b>199,3</b>	<b>150,6</b>
<b>H011</b>	60	89	54	<b>67,7</b>	<b>18,7</b>	416	161	85	<b>220,7</b>	<b>173,4</b>
<b>H012</b>	2	0	0	<b>0,7</b>	<b>1,2</b>	359	130	200	<b>229,7</b>	<b>117,3</b>

In diesen wurde die ausplattierte Zellzahl von  $1 \times 10^4$  auf  $6 \times 10^3$  Zellen pro Untersuchungsgefäß reduziert, da die Gesamtkolonienanzahl in den ersten beiden Versuchen zum Teil sehr hoch war. Zusätzlich wurden abweichend zu den ersten beiden Versuchen die Dreieransätze aus einem Zellsuspensionsansatz direkt pipettiert, der auf eine Zellzahl von  $6 \times 10^3$  Zellen pro 500µl eingestellt war. Des Weiteren wurde auf die zusätzlichen Linien R011 und R012 und H012 verzichtet. Das Ergebnis waren wiederum unterschiedliche Kolonienzahlen in Exp.3 und 4 (Tab 3.5, S.98), die statistisch nicht auswertbar waren. Eindeutig jedoch war die Tendenz, dass die mit dem Leervektor stabil transfizierten Zellen im Vergleich mit den nativen Zellen mehr Kolonien bildeten, während die mit dem FAM107A-ORF-Vektor stabil transfizierten Zellen zwar ebenfalls mehr Kolonien bildeten als die nativen, aber in der Regel mit einer reduzierten Kolonienzahl gegenüber den mit dem Leervektor transfizierten Zellen. Die Unterschiede in der Anzahl der Kolonien differierten sehr: z.B. bei den RCC-1-Zellen gab es zwei- (Exp.1, Tab 3.4) bis 17fach (Exp.4, Tab 3.5, S. 98) so viele Kolonien in den mit Leervektor transfizierten Zellen wie in den nativen Zellen; in den mit FAM107A-ORF transfizierten Zellen ~20% weniger Kolonien (Exp.2, Tab 3.4) als in den mit Leervektor transfizierten Zellen beziehungsweise ~80% weniger (Exp.1; Tab 3.4). Bezüglich der Morphologie der Kolonien fiel auf, dass die Kolonien der mit dem Leervektor transfizierten Zellen in der Regel kleiner waren, die mit dem FAM107A-ORF-Vektor transfizierten Zellen jedoch größer (Abb 48). Somit

wurde nach Transfektion des FAM107A-ORF-Vektors die Wirkung nach Transfektion des Leervektors, Wachstum von Kolonien zu induzieren, in diesen Zellsystemen wieder reduziert.



**Abb 48: Morphologie von Zellkolonien in Weichagarmedium.** Die mit Leervektor transfizierten Zellen bildeten mehr Kolonien als die mit FAM107A-ORF-Vektor transfizierten Zellen, die aber größere Kolonien bildeten. [A] RCC-1; [B] RCC-V; [C] R08; [D] HTB-46; [E] HTB-V; [F] H08 (Objektiv-Vergrößerung 40X).



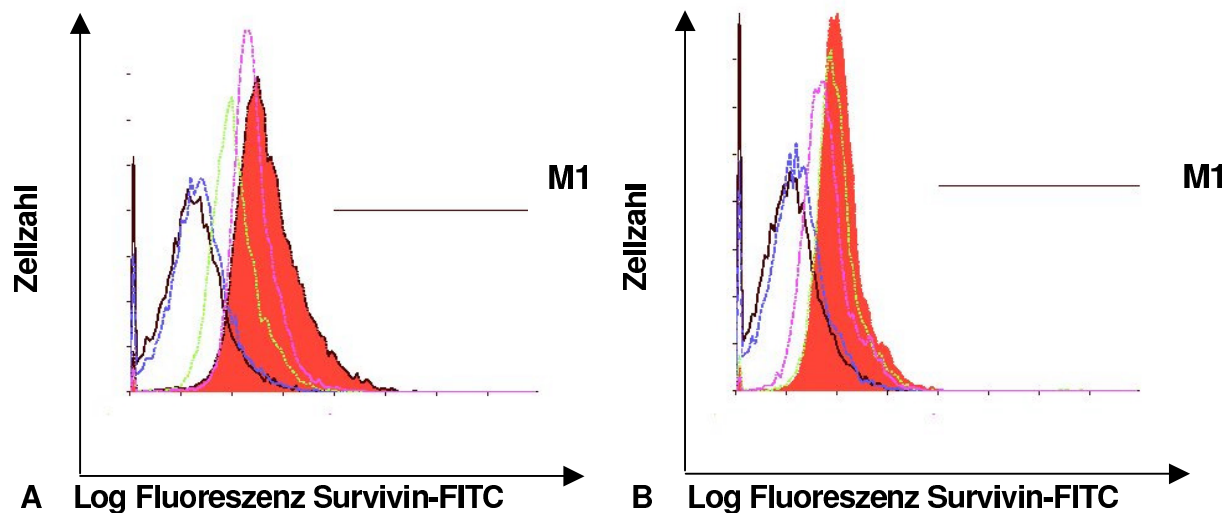
**Tab 3.5: Anzahl gewachsener Kolonien in Weichagarmedium, Exp.3 und 4.** Das Ergebnis der weiteren Proliferationsstudien der Zellen in Weichagar bestätigte, dass die mit Leervektor transfizierten Zellen mehr Kolonien bildeten als die nativen Zellen.

	Experiment 3					Experiment 4				
	Probe1	Probe2	Probe3	MW	STABW	Probe1	Probe2	Probe3	MW	STABW
<b>RCC-1</b>	4	6	12	<b>7,3</b>	<b>4,2</b>	0	35	0	<b>11,67</b>	<b>20,2</b>
<b>RCC-V</b>	51	37	43	<b>43,7</b>	<b>7,0</b>	246	160	185	<b>197</b>	<b>44,2</b>
<b>R03</b>	186	197	186	<b>189,7</b>	<b>6,4</b>	63	141	51	<b>85</b>	<b>48,9</b>
<b>HTB-46</b>	0	2	0	<b>0,7</b>	<b>1,2</b>	0	19	0	<b>6,333</b>	<b>11,0</b>
<b>HTB-V</b>	284	256	280	<b>273,3</b>	<b>15,1</b>	45	370	209	<b>208</b>	<b>162,5</b>
<b>H08</b>	39	19	23	<b>27</b>	<b>10,6</b>	16	132	140	<b>96</b>	<b>69,4</b>

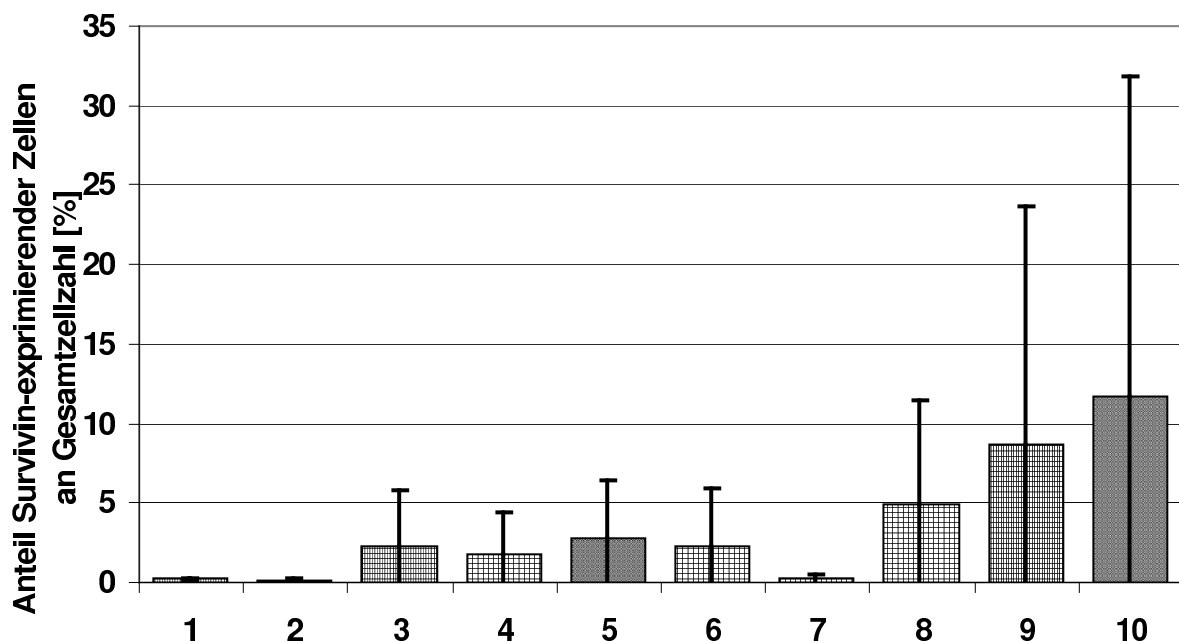
### 3.5.3.2 Expression von Survivin

Einen weiteren Hinweis auf die Tumorigenität von Zellen kann die Expression von Survivin geben.

Die Expression von Survivin wurde durchflusszytometrisch gemessen. Die RCC-1- und die HTB-46-Zellen zeigten eine minimale basale Survivin-Expression (*Abb 49, Abb 50*). Die Anzahl Survivin-positiver Zellen war in den nativen und transfizierten RCC-1-Zellen vergleichbar. In den HTB-46-Zellen ließ sich eine geringfügige Zunahme der Survivin-Expression sowohl in den mit dem Leervektor als auch mit dem FAM107A-ORF-Vektor transfizierten Zellen messen. Insgesamt wurde die Expression von Survivin in den untersuchten Zellsystemen nicht wesentlich beeinflusst. Somit war keine Veränderung der Tumorigenität der Zellen anhand des Markers Survivin feststellbar.



**Abb 49: Expression von Survivin in HTB-46- [A] und RCC-1-Zellen [B].** Die Histogramme zeigen die Anzahl Survivin-positiver Zellen. Die X-Achse gibt die Fluoreszenzintensität der Einzelmessungen wieder, die Y-Achse die Anzahl der Zellen: HTB-46- bzw. RCC-1-Zellen (schwarze Kurve, Kontrolle, nicht gefärbte Zellen); 2: HTB-46- bzw. RCC-1-Zellen (blaue Kurve, Isotypkontrolle, nach Inkubation mit Maus Ig G1 Immunglobulin); 3: HTB-46- bzw. RCC-1-Zellen (grüne Kurve, gefärbte Zellen); 4: HTB-V- bzw. RCC-V-Zellen (violette Kurve, gefärbte Zellen); 5: H08- bzw. R03-Zellen (rot ausgefüllte Kurve, gefärbte Zellen): Die leichte Rechtsverschiebung der Kurven im Vergleich zu den Kontrollen zeigte die basale Expression von Survivin in den Zellen.

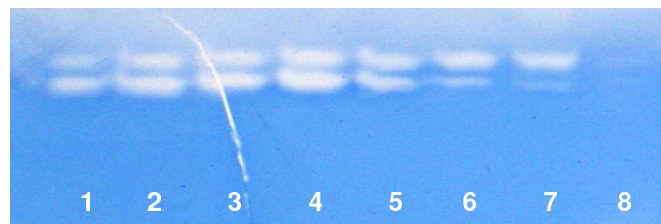


**Abb 50: Anteil Survivin-exprimierender Zellen an der Gesamtzellzahl der jeweils untersuchten Zellen.** (MW  $\pm$  STABW, n=3). Ausgewertet wurde der Anteil Survivin-exprimierender Zellen, der anhand des gesetzten Markers M1 im Originalhistogramm (vgl. Abb 49) bestimmt wurde: 1: RCC-1-Zellen (Kontrolle, unbehandelt); 2: RCC-1-Zellen (Isotypkontrolle, nach Inkubation mit Maus Ig G1 Immunglobulin); 3: RCC-1-Zellen, gefärbt; 4: RCC-V-Zellen, gefärbt; 5: R03-Zellen, gefärbt; 6: HTB-46-Zellen (Kontrolle, unbehandelt); 7: HTB-46-Zellen (Isotypkontrolle, nach Inkubation mit Maus Ig G1 Immunglobulin); 8: HTB-46-Zellen, gefärbt; 9: HTB-V-Zellen, gefärbt; 10: H08-Zellen, gefärbt.

### 3.5.3.3 Nachweis des Invasivitätsmarkers MMP-2 durch Zymografie

Ein Merkmal für die Malignität von Tumorzellen ist ihre Fähigkeit, zu metastasieren. Eine wichtige Rolle hierbei spielen die MMP. Es sollte überprüft werden, ob die Expression von FAM107A-ORF einen Einfluss auf die Expression der MMP in den untersuchten Zelllinien hat.

Die Gesamtexpressionsrate war bei den drei durchgeführten Versuchen unterschiedlich, was sich in der Stärke der Gelbanden zeigte (*Abb 51*, exemplarische Darstellung eines Versuches). Bei der HTB-46-Zelllinie zeigte die mit dem FAM107A-ORF-Vektor transfizierte Zelllinie eine verringerte Expression der MMP-2 beziehungsweise in einem von drei Versuchen keine. Auch bei der Negativkontrolle, Vollmedium mit FCS, war in allen Versuchen eine Degradation der Gelatine zu finden und somit Aktivität von MMP. Dieser Versuch gibt einen Hinweis darauf, dass die Expression von FAM107A-ORF die messbare Aktivität von MMP in HTB-46-Zellen zu reduzieren vermochte, nicht aber in den RCC-1-Zellen.

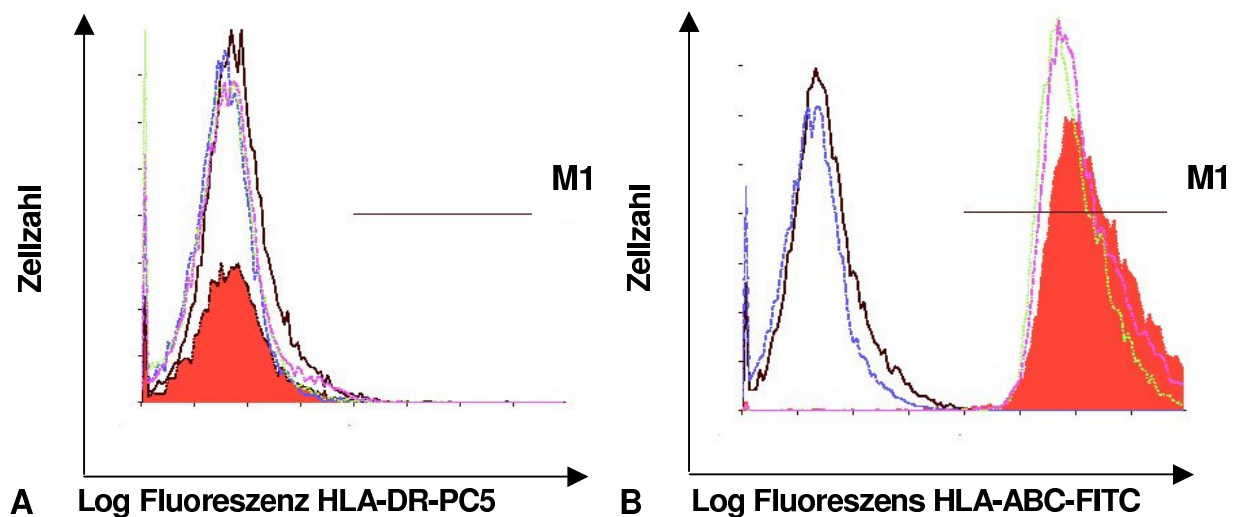


**Abb 51: Zymogramm der stabil transfizierten Zelllinien.** Es erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung der Metalloproteinasen, Detektion durch Gelatineverdau und Coomassieblaufärbung. Die Stellen, in denen die Gelatine verdaut wurde, zeichneter sich als helle Bereiche im ansonsten blau gefärbten Gel ab. Man erkennt Banden der Metalloproteinasen. Spurenbelegung: 1. RCC-1; 2: RCC-V; 3: R03; 4: HTB-46; 5: HTB-V; 6: H08, 7: Medium mit FCS; 8: Medium ohne FCS. (Artefakt durch Riss; ein repräsentatives Gel von drei durchgeführten Experimenten).

### 3.5.3.4 Expression der Oberflächenantigene HLA-DR und HLA-ABC

Da in Tumorzellen HLA-ABC häufig herunterreguliert ist und eine erratische Expression von HLA-DR vorkommen kann, wurde die HLA-ABC- und HLA-DR-Expression auf nativen und stabil transfizierten Zellen untersucht.

HLA-DR wurde in allen Zellen nicht exprimiert (*Abb 52 [A]*). Die Histogrammkurve von der Linie R03 war erniedrigt aufgrund einer geringen Gesamtzellzahl der Probe. HLA-ABC wurde auf zahlreichen Zellen detektiert (*Abb 52 [B]*). Die RCC-1- und die HTB-46-Zellen exprimierten als native und als transfizierte Zellen HLA-ABC. Die ektopische Expression von FAM107A-ORF hatte keinen Einfluss auf die MHC-Antigenexpression HLA-ABC und HLA-DR in den untersuchten Zellsystemen.



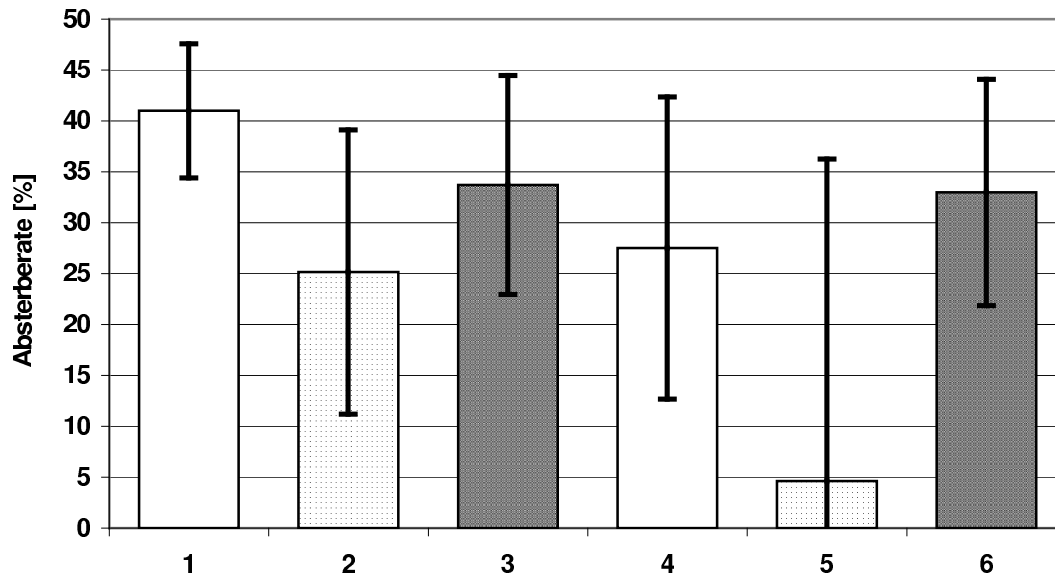
**Abb 52: Expression von HLA-DR [A] bzw. HLA-ABC [B] in RCC-1-Zellen.** Das Histogramm zeigt die Häufigkeitsverteilung der Zellzahlen in Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals HLA-DR-PC5 bzw. HLA-ABC-FITC: RCC-1-Zellen (Kontrolle, unbehandelt, schwarze Kurve); 2: RCC-1-Zellen (Isotypkontrolle Maus, blaue Kurve); 3: RCC-1-Zellen (gefärbt, grüne Kurve); 4: RCC-V-Zellen (gefärbt, violette Kurve); 5: R03-Zellen (gefärbt, rot ausgefüllte Kurve). Mit Hilfe des Markers M1 wurde der Prozentsatz exprimierender Zellen im Vergleich zu den Negativkontrollen bestimmt. Exemplarische Darstellung eines von drei durchgeführten Experimenten.

### **3.5.3.5 Einfluss der FAM107A-ORF-Expression auf die Sensitivität der RCC-1- bzw. HTB-46-Zellen gegenüber Cisplatin**

Bei der Behandlung maligner Erkrankungen tritt immer wieder eine Resistenzbildung gegenüber Zytostatika auf. Es wurde jetzt überprüft, ob eine ektopische Expression von FAM107A-ORF eine Auswirkung auf die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber einer Cisplatinbehandlung hat.

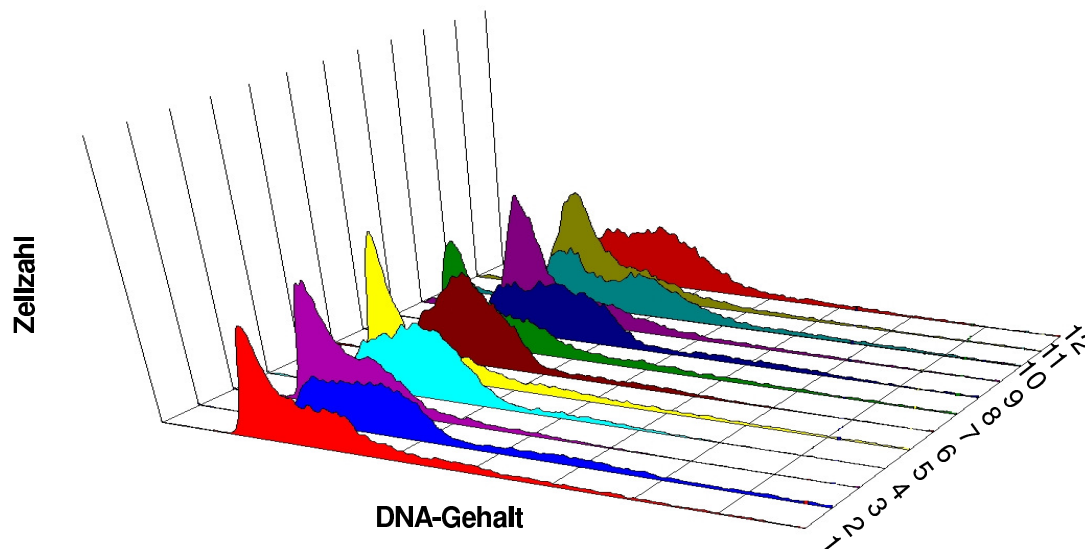
Zunächst wurde die Absterberate der Zellen als Maß für den Einfluss von Cisplatin auf die Zellen überprüft. Diese war in den mit dem FAM107A-ORF-Vektor transfizierten RCC-1-Zellen im Mittel gegenüber den nativen RCC-1-Zellen reduziert, während sie in den mit dem FAM107A-ORF-Vektor transfizierten HTB-46-Zellen erhöht war (Abb 53). Folglich schien die FAM107A-ORF-Expression in den RCC-1-Zellen die Empfindlichkeit für Cisplatin herabzusetzen, während sie diese bei den HTB-46-Zellen erhöhte. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass FAM107A-ORF in Abhängigkeit von dem Tumorzelltyp die Empfindlichkeit gegenüber Cisplatin modulieren konnte. In beiden Zelllinien, RCC-1 und HTB-46, war in den mit dem Leervektor transfizierten Zellen eine geringere Absterberate festzustellen als in den

mit dem FAM107A-ORF-Vektor transfizierten. In den fünf durchgeführten Versuchen waren hohe Standardabweichungen festzustellen (STABW~40 bei den HTB-V-Zellen), weswegen die Aussagen des Experimentes nur Tendenzen darstellen, keine Signifikanzen.



**Abb 53: Absterberate der Zellen in Prozent nach Cisplatin-Behandlung.** Grafische Darstellung des Ergebnisses einer 24h-Dauerbehandlung mit Cisplatin, n=5, MW  $\pm$  STABW: 1: RCC-1-Zellen; 2: RCC-V-Zellen; 3: R03-Zellen; 4: HTB-46-Zellen; 5: HTB-V-Zellen; 6: H08-Zellen.

Die Fluoreszenzdaten der Zellzyklusanalyse ließen sich nur bei den unbehandelten Proben mit dem Programm Cylchred auswerten. Nach der Behandlung mit 2 $\mu$ M Cisplatin für 24h befand sich bei allen untersuchten Zellen eine verringerte Anzahl an Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Phase (Abb 54). Der Hauptteil der Zellen befand sich in der S- und G<sub>2</sub>/M-Phase. Durch diese Verteilung konnten nicht in allen Proben zuverlässig die „peaks“ der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>-Phase detektiert werden. Somit konnten die Anteile der Zellen in den unterschiedlichen Phasen nicht errechnet werden. Es zeigten sich hierbei nur geringfügige Unterschiede zwischen den nativen und den stabil transfizierten Zelllinien.



**Abb 54: Zellzyklusanalyse der unbehandelten und der mit Cisplatin behandelten Zelllinien.** Die Abbildung veranschaulicht die unterschiedliche Verteilung der Zellen über die Zellzyklusphasen und deren Beeinflussung durch die Cisplatinbehandlung. Die unbehandelten Zelllinien werden durch die ungeraden, die behandelten durch die geraden Zahlen dargestellt. 1: RCC-1; 2: RCC-1 Cisplatin-behandelt; 3: RCC-V; 4: RCC-V Cisplatin-behandelt; 5: R03; 6: R03 Cisplatin-behandelt; 7: HTB-46; 8: HTB-46 Cisplatin-behandelt; 9: HTB-V; 10: HTB-V Cisplatin-behandelt; 11: H08; 12: H08 Cisplatin-behandelt. Ergebnisse einer exemplarischen Zellzyklusanalyse von fünf Experimenten.

Surrogatmarker für *In-vitro*-Tumorigenität wie Wachstum im halbfesten Medium, Expression von Survivin oder Expression von MMP konnten keinen Hinweis darauf geben, dass die Expression der FAM107A-orf-mRNA eine wesentliche tumorsuppressive Wirkung in den untersuchten Zellsystemen zeigte.

Unterschiede zwischen den RCC-1- und den HTB-46-Zellen wurden deutlich. So vermochte die Expression von FAM107A-ORF die messbare Aktivität von MMP in HTB-46-Zellen zu reduzieren, nicht aber in den RCC-1-Zellen. Ebenfalls wurde die Sensitivität der HTB-46-Zellen gegenüber Cisplatin in den mit FAM107A-ORF-Vektor transfizierten Zellen erhöht, nicht aber bei den RCC-1-Zellen.

## **4 Diskussion**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, FAM107A, das in Tumoren herauf- oder herunterreguliert ist, auf seine Funktion als TSG zu überprüfen, wie es in der Literatur beschrieben ist. Da Weiteres zur Funktion nicht bekannt ist, wurde ein breites Spektrum an Untersuchungen durchgeführt. Diese sollten einerseits einen Beitrag zur Biologie und Genetik der malignen Transformation liefern und andererseits prüfen, ob das FAM107A-Gen beziehungsweise sein/e Produkt/e Ziel für therapeutische Interventionen sein kann.

Zu Beginn der Arbeit waren nur einzelne Daten zu FAM107A bekannt. Während der eigenen Labortätigkeiten wurden von anderen Arbeitsgruppen Daten zu FAM107A publiziert. Die Arbeiten, die hauptsächlich oder im Nebenschluss Ergebnisse zu FAM107A liefern, beschreiben den Einsatz verschiedener Methoden, darunter auch cDNA-Microarray-Analysen, RT-PCR- oder Northern-Blot-Experimente. Die Daten aus der Literatur zeigten ebenso widersprüchlich erscheinende Ergebnisse wie die eigenen oben beschriebenen.

### **4.1 Methodische Aspekte und Vorversuche**

Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen bekannt, die beschreiben, dass Zelllinien falsch klassifiziert sein können, so auch Zelllinien vom National Cancer Institute, USA, NCI (Wang et al., 2006). Demnach stammen Linien wie SN12c und H23, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, nicht - wie bislang angenommen - aus der Niere beziehungsweise der Lunge. Diese Ergebnisse, die durch Computeranalysen von Expressionsdaten gewonnen wurden, sollten aber mit weiteren Methoden wie z.B. mit einer Immunophänotypisierung überprüft werden (Quentmeier et al., 2001). Bei der Linie HBL-100, die ebenfalls in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, wurde nach ATCC-Analysen entgegen dem vorgeblich weiblichen Ursprung ein Y-Chromosom detektiert (siehe Datenbank der ATCC, „Misidentified Cell Lines“) (Hollricher, 2007). Eigene Analysen konnten den Ursprung der angeführten Zelllinien nicht bewerten. Die bereits vor diesen Erkenntnissen gewonnen Expressionsdaten, die mit diesen Zelllinien gewonnen wurden, wurden in der Arbeit belassen. Bei diesen sollte jedoch bedacht werden, dass die Identität dieser Linien zweifelhaft ist.

Auch die Karyotypisierung der meisten in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien brachte keinen Aufschluss über die Herkunft der Zellen (*Abb 57, Tab 8.11*, S. 154). Die Karyotypisierung ist nur als Hilfsmittel für die Identifizierung von Zelllinien zu werten (W.G. Dirks, DSMZ, persönliche Mitteilung), sie gilt nicht als Authentizitätsnachweis. Die in vorliegender Arbeit erstellten Karyogramme zeigten Abweichungen von den Literaturdaten, wie es auch bei drei epithelialen ovariellen Tumorzelllinien beschrieben wurde (Quellet et al., 2008). Dies ist ein grundsätzliches Phänomen der Zellkultur (Hughes et al., 2007) und wird mit chromosomaler Instabilität erklärt, die durch Defekte im DNA-Reparatursystem verursacht ist (W.G. Dirks, DSMZ, persönliche Mitteilung). So wurden bei der Linie H23, einer als männlich beschriebenen Zelllinie, zwei X-Chromosomen und kein Y-Chromosom detektiert. Ob ein X-Chromosom dupliziert wurde und das Y-Chromosom verloren gegangen ist oder ob es sich um eine weibliche Zelllinie handelt, ist nicht nachweisbar. Y-Verluste sind relativ häufig, wie es z.B. für Pankreaskarzinome beschrieben wurde (Wallrapp et al., 2000). Andere Zelllinien wie die Linie ARPE-19 scheinen genetisch stabiler zu sein und zeigen noch weitgehend normale Karyotypen.

Mikrosatelliten sind sehr stabil, ihre Analyse gilt als anerkanntes Authentifizierungsverfahren. Von den in der Arbeit verwendeten Zelllinien wurden aus finanziellen Gründen stichprobenartig nur die Linien HTB-46, MCF7 und HeLa mit Fingerprintanalysen überprüft (*Abb 9, Tab 3.2*, S.57). Die von den Daten der Datenbanken ATCC und JCRB abweichende Anzahl an „repeats“, die bei der Linie HTB-46 in einem Allel des vWA-Locus gefunden wurde, kann eine sogenannte Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) darstellen. Diese kann durch Fehler im „Mismatch-Repair-System“ (MMR-System) Veränderungen in der Anzahl an Wiederholungen der Tetranukleotide in den STR verursachen. Weitere Abweichungen in den STR der Linie HTB-46 im Vergleich zu der Datenbank der DSMZ zeigen, dass die ehemals in dieser Sammlung als Caki-1 geführte Zelllinie eine andere ist als die der beiden anderen Zellbanken und auch mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Linie nicht übereinstimmt. Diese Linie wurde aber für die stabilen Transfektionen und die sich anschließenden Untersuchungen verwandt, da sie schon in anderen Experimenten transient transfiziert worden war und sich dort eine proliferationshemmende Aktivität von FAM107A gezeigt hatte (Wang et al., 2000).



Um einen Überblick über das Expressionsverhalten von FAM107-mRNA zu bekommen, wurden sämtliche Proben mit qualitativer RT-PCR untersucht. Die RT-PCR wurde als Methode gewählt, da alternative Methoden wie Northern-Blot und Nuklease-Protection-Assay nicht so sensitiv wie die RT-PCR sind (Gilliland et al., 1990). Des Weiteren werden für die RT-PCR nur kleine RNA-Mengen benötigt. Für die RT-PCR-Analyse wurde die Zweischrittmethode angewandt, bei der zunächst die RT und in einem zweiten Schritt mit einem Aliquot der RT die RT-PCR durchgeführt wurde. Das Zweischrittverfahren gegenüber der Einschrittmethode wurde gewählt, um mit unterschiedlichen Primerpaaren dieselbe cDNA analysieren zu können.

Sämtliche Expressionsdaten der vorliegenden Arbeit sind qualitativer Art, die das Vorhandensein beziehungsweise Nichtvorhandensein von FAM107A-Transkripten unter den gegebenen Bedingungen beschreiben. Z.T. wurden trotz aller Sorgfalt in unterschiedlichen Analysen abweichende Ergebnisse erhalten. Eine Artefaktbildung in der RT-PCR konnte bei der Empfindlichkeit dieser Methode nicht ausgeschlossen werden, sollte aber durch Wiederholung der Experimente weitgehend ausgeschlossen werden. Die Multiplex-PCR wurde nicht verwendet, da Primerdimere oder unspezifische Produkte mit der Bildung der spezifischen Produkte interferieren können. CDNA kommt zwar prinzipiell als „Multi-Template“ für eine Multiplex-PCR in Frage, unterschiedliche Primerpaare können jedoch mit voneinander abweichenden Effizienzen hybridisieren. Gründe dafür liegen z.B. in unterschiedlichen Längen der zu amplifizierenden Sequenzen und im unterschiedlichen GC-Gehalt (Polz and Cavanaugh, 1998) oder auch darin, dass (teil-)homologe Sequenzen zu Artefakten rekombinieren (Meyerhans et al., 1990). Dies kann besonders stören, wenn eines der zu untersuchenden Transkripte deutlich stärker exprimiert wird als das andere. Wegen dieser Unwägbarkeiten wurde für das zu untersuchende Gen FAM107A und das „Housekeeping“-Gen FLNB zwar jeweils ein gemeinsamer Mastermix hergestellt, aber nach Probenzugabe der Ansatz geteilt und die Analyse mit den unterschiedlichen Primerpaaren in getrennten Reaktionsgefäßen durchgeführt.

Die cDNA-Synthese kann mit unterschiedlicher Effizienz verlaufen. Als Beweis für den Erfolg der cDNA-Synthese kann man einen internen Standard, ein nicht reguliertes sogenanntes „Housekeeping“-Gen in der RT-PCR-Analyse mitführen. Als „Housekeeping“-Gen wurde in dieser Arbeit FLNB gewählt, da es sich in eigenen Analysen als konstitutiv und ubiquitär exprimiertes Gen erwies, das offenbar nicht zelltyp- oder zellstadiumabhängig beziehungsweise von äußeren Einflüssen reguliert wird, Eigenschaften, die von einem „Housekeeping“-Gen gefordert werden (Gillsbach

et al., 2006; Vandesompele et al., 2002). Üblicherweise werden oft andere Gene wie 18S rRNA oder Actin beta als „Housekeeping“-Gen verwendet (de Kok et al., 2005). Da jedoch die RT mit oligo-dT-Primern durchgeführt wurde, kam 18S rRNA als Kontrolle nicht in Frage. Actin beta zeigte in unterschiedlichen Zelllinien in eigenen Analysen unspezifische Banden und wurde deshalb nicht als Kontrolle verwendet. FLNB als „Housekeeping“-Gen zu nehmen, ist insofern als Kontrolle für FAM107A interessant, als beide Gene nicht nur auf Chromosom 3 sondern auch auf benachbarten Chromosomenabschnitten liegen. So ist die Expression von FLNB-mRNA ein Hinweis dafür, dass keine größeren Chromosomenabschnitte deletiert sind. Zugleich diente diese Kontrolle zum Aufspüren von PCR-Produkten von genomischer DNA. Das genomische Amplikon umfasst nur 459bp und konnte somit unter den Bedingungen der gewählten RT-PCR mitamplifiziert werden.

Verhältnismäßig viele Versuche wären nötig gewesen, um beschreibende Statistiken zu erstellen. Die geringe Anzahl der Versuche innerhalb einer Versuchsreihe und die Inhomogenität der Daten ermöglichten keine konventionellen statistischen Verfahren zur Beurteilung der Ergebnisse. Diese Verfahren würden zu ungenauen Beschreibungen der Versuchsergebnisse führen. Selbst neuere statistische Verfahren wie etwa neuronale Netzwerke scheitern bei nicht ausreichenden Datenmengen oder der Inhomogenität der Daten. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit eine deskriptive Darstellung der Daten gewählt.

Als Vorversuche für die Expressionsanalysen wurden diverse Einflüsse wie zirkadianer Rhythmus, der Zellzyklus, die Konfluenz oder die Temperatur auf die FAM107A-Expression in Zellkultursystemen untersucht. Um den Einfluss zirkadianer Rhythmik auf die transkriptionelle Aktivität des FAM107A-Gens zu analysieren, wurden zum einen Zellen gewählt, bei denen zirkadiane Suszeptibilität für Phagozytose durch Lichtexposition beschrieben wurde, wie es bei den ARPE-19-Zellen der Fall ist (Irschick et al., 2004). Zum anderen wurden HeLa-Zellen untersucht, die in der Regel in den durchgeführten Versuchen keine messbare Expression von FAM107A-mRNA zeigten und bei denen kein offensichtlicher zirkadianer Rhythmus beschrieben wurde (Ünsal-Kaçmaz et al., 2005). Des weiteren wurden RCC-1- und SN12c-Zellen analysiert, die keine eindeutige Expression von FAM107A-mRNA in eigenen Versuchen zeigten. Zur Synchronisierung des Zellzyklus vor der zirkadianen Analyse wurde ein Doppel-Thymidinblock

durchgeführt. Erfolgreich war dies bei den Zelllinien ARPE-19, RCC-1 und SN12c, die in der G<sub>1</sub>/S-Phase synchronisierbar waren. HeLa-Zellen ließen sich nicht in der vorliegenden Arbeit synchronisieren. HeLa-S3-Zellen hingegen, eine Subpopulation von HeLa-Zellen, ließen sich in die S-Phase verschieben (Whitfield et al., 2002). Die Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht durch Lichtexposition stimuliert. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen zeigte die Expression von FAM107-mRNA keinen zirkadianen Rhythmus. Versuch 1 zeigte eine Expression von FAM107-mRNA in insgesamt mehr Proben als Versuch 2, wofür keine Erklärung gefunden werden konnte. Aus logistischen Gründen konnte der Versuch zur Überprüfung dieser Unterschiede in der Expression nicht wiederholt werden.

Des weiteren ließ sich die FAM107A-Expression in den untersuchten Zelllinien RCC-1, SN12c und ARPE-19 nicht der G<sub>1</sub>/S-Phase zuordnen. Eine Korrelation der FAM107A-mRNA-Expression zu weiteren Zellzyklusphasen war nicht möglich, da nach erfolgter initialer Synchronisierung der Zellen diese den Zellzyklus wieder asynchron durchliefen. Außerdem wurde die RNA-Extraktion jeweils aus der Gesamtpopulation einer Zelllinie zu dem untersuchten Zeitpunkt gewonnen, somit von Zellen, die sich in unterschiedlichen Zellzyklusphasen befanden. Insgesamt konnte man aber feststellen, dass die Zellzyklusphasen keinen substantiellen Einfluss auf die Expression von FAM107A in den untersuchten Zelllinien hatten.

Die Nicht-Induzierbarkeit der FAM107A-Expression durch die Zelldichte in den drei untersuchten Zelllinien ARPE-19, SN12c und HeLa entsprach Beobachtungen, dass Tumorzelllinien nicht gegenüber Zell/Zellkontakt und damit Dichtigkeit reagieren (Cooper, 2000). In oralen Karzinomzelllinien dagegen wurde z.B. eine Beeinflussung einzelner Gene durch Konfluenzstatus beziehungsweise Passagenanzahl festgestellt, nicht aber eine der globalen Genexpression (Ruutu et al., 2004). FAM107A gehört aber offensichtlich nicht zu dieser Klasse von Genen.

Die Nicht-Induzierbarkeit der FAM107A-Expression durch eine Temperaturerhöhung (Hitzeschock) wies darauf hin, dass FAM107A nicht zu den klassischen Hitzeschockproteinen wie HSP70 oder HSP60 zu zählen ist, die bei hohen Temperaturen eine erhöhte Transkriptionsrate aufweisen (Abravaya et al., 1991). Die Expression von FAM107A-mRNA wurde nach einer Erholungsphase von 30min bei 37°C nach der zweistündigen Inkubation bei 43°C überprüft. Diese Vorgehensweise wurde von anderen Versuchen abgeleitet, bei denen die Erholungsphase für die Translokation von Transkriptionsfaktoren wie NF-κB aus dem Zytoplasma in den Zellkern und dessen Aktivierung nötig war (Kretz-Remy et al., 2001). Da das

Genprodukt von FAM107A als ein nukleäres Protein beschrieben wird, aber auch im Rahmen des HUPO-Plasmaprotein-Projekts im Plasma detektiert wurde (Omenn et al., 2005), sind auch solche Migrationen/Translokationen für FAM107A denkbar.

Nach diesen Vorversuchen kann bei den folgenden Expressionsanalysen weitgehend ausgeschlossen werden, dass die detektierten Expressionen in den gegebenen Zellsystemen durch Faktoren wie zirkadianer Rhythmik, Temperatur, Zellzyklus oder Konfluenz substantiell beeinflusst werden.

## 4.2 Expressionsanalysen

Die eigenen qualitativen RT-PCR-Analysen verdeutlichen, dass mehr Normalproben als Tumorproben FAM107A-mRNA exprimierten. Dies bestätigten die Daten der Literatur, die eine Herunterregulation von FAM107A bei vielen Tumoren beschreiben (Ancona et al., 2006; Evans et al., 2001; Fathallah-Shaykh HM, 2003; Febbo und Sellers, 2003; Kumazaki et al., 2004; Skubitz et al., 2003; Spira et al., 2004; Vanaja et al., 2006; Wang et al., 2000; Wissmann, 2002; Zheng et al., 2005). Die Einzeluntersuchungen wurden von Metaanalysen unterstützt, wobei FAM107A auch als ein Diskriminatorgen zwischen Normal- und Tumorgewebe eingestuft wurde (Langston et al., 2003). Dabei kann es sich sowohl um eine Herunterregulation der Expression von FAM107A handeln als auch um eine Hochregulation, wie weitere bioinformatische Analysen zeigten. Diese berichteten über eine Herunterregulation in Mamma-, Prostata-, Retina-, Bronchial- und Gehirntumoren, aber auch eine Hochregulation in ovariellen und Kolontumoren (Chen et al., 2006). Eine Korrelation der FAM107A-Expression mit dem Alter oder Geschlecht der Gewebedonoren konnte in den eigenen Analysen nicht aufgedeckt werden. Die Analyse der nach ICD-O-3-Code sortierten Zellen und Gewebe beziehungsweise Literaturangaben (Tabellen 8.2 bis 8.5, S.147f.) führte aufgrund diskrepanter Expressionsdaten ebenfalls nicht weiter. Widersprüchliche Expressionsdaten der eigenen Analysen zu Literaturdaten können sowohl funktional als auch zufällig sein. Auch kann z.B. die Art der Probengewinnung Einfluss auf die Ergebnisse haben, da Tumorproben mit Normalgewebe durchsetzt sein können. Zum Teil wurden die Proben vom Pathologen verifiziert (Febbo and Sellers, 2003) oder sogar quantifiziert, indem histologisch geprüft wurde, dass die verwendeten Proben nur eine minimale Anzahl an Stromazellen (Normalgewebe) enthielten (Vanaja et al., 2006). Eine

Durchsetzung von Tumorgewebe mit Normalgewebezellen könnte zu einem falsch positiven Ergebnis der FAM107A-Expression führen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Normalgewebeproben entstammten aus dem Kopf- und Halsbereich, da einerseits entsprechende Tumorproben zur Verfügung standen und andererseits die Expression in zahlreichen weiteren Normalgewebeproben bereits in der Literatur beschrieben worden war (Wang et al., 2000). Lungen- und Zungen-Normalgewebe exprimierten größtenteils FAM107A-mRNA, z.T. auch Tonsillengewebe, nicht jedoch Parotis-Normalgewebe. Bei der Untersuchung von unterschiedlichen Fibroblastenproben zeigten einige FAM107A-mRNA-Expression, andere nicht. Eine komparative cDNA-Microarray-Analyse früherer Passagen von primären Fibroblastenzelllinien, die aus drei unterschiedlichen Spezies, nämlich *Homo sapiens*, *Pan paniscus* und *Gorilla gorilla* etabliert worden waren, zeigte eine vergleichbare Expression von FAM107A (beispielhaft als GEO DataSet angeben, GDS340) (Karaman et al., 2003). Eine FAM107A-Expression war in drei unterschiedlichen Keratinozytenzelllinien nicht feststellbar; dies zeigte auch eine semiquantitative RT-PCR-Analyse von normalen Keratinozyten (Becker et al., 2002). Eigene RT-PCR-Analysen von Nierenzellkarzinom-, Bronchialkarzinom- und Melanomzelllinien zeigten Ergebnisse mit und ohne messbare Expression von FAM107A-mRNA. Im Unterschied zu diesen Analysen wurde bei früheren RT-PCR-Analysen keine Expression von FAM107A in den Nierenkarzinomzelllinien HTB-46 und HTB-45 detektiert (Wang et al., 2000). Die unterschiedlichen Expressionen können auf eine ungeklärte Regulation der FAM107A-Expression hindeuten, aber auch auf eine Instabilität der Zelllinien. Während Melanomzelllinien in den eigenen RT-PCR-Analysen unterschiedliche Expressionen aufwiesen, zeigte eine cDNA-Microarray-Analyse eine Expression von FAM107A in normaler Haut versus geringerer oder keiner Expression in benignen Haut-Naevi und primären malignen Melanomen (GDS1375) (Talantov et al., 2005).

In den Bronchialkarzinomzelllinien H23 und H460 wurden in eigenen qualitativen RT-PCR-Analysen keine eindeutige Expression von FAM107A-mRNA gefunden. In Metaanalysen von cDNA-Microarraydaten wurde aber eine Herunterregulation in Bronchialkarzinomen beschrieben (Chen et al., 2006; Lu et al., 2007). Hier fehlten jedoch die Angaben, um welche Bronchialkarzinome es sich handelte. Eine weitere cDNA-Microarray-Analyse zeigte die Herunterregulation von FAM107A in zehn bronchialen Adenokarzinomen (GDS1650 für Normalgewebe: GEO Sample, GSM 7958 bis GSM47976; für Tumorgewebe GSM36757 bis GSM36776) (Stearman et al.,

2005). So sprechen die cDNA-Microarraydaten für eine Herunterregulation von FAM107A in Gewebeproben von Bronchialkarzinomen, während die Analysen in etablierten Zelllinien dies nicht bestätigen konnten. Dies spricht für unbekannte Regulationsmechanismen der Expression von FAM107A in der Zellkultur oder ist durch die genetische Instabilität der Zelllinien bedingt.

Die Rolle von FAM107A beim Mammakarzinom bleibt weiterhin ungeklärt. CDNA-Microarraydaten zeigten eine Herunterregulation von FAM107A-mRNA (Lu et al., 2007), in eigenen qualitativen RT-PCR-Analysen war in der Mammakarzinomzelllinie MCF7-Linie keine FAM107A-mRNA-Expression messbar; in BRCA1-positiven, hereditären im Vergleich zu sporadischen Mammakarzinomen, welche nicht weiter charakterisiert wurden, war FAM107A-mRNA überexprimiert (Dudaladava et al., 2006). Dies weist auf eine unterschiedliche Expression von FAM107A in Abhängigkeit vom Tumortyp hin. Aber auch unterschiedliche Regulation der transkriptionellen Aktivität von FAM107A ist möglich.

Larynx- und Oropharynxkarzinomzelllinien zeigten keine Expression von FAM107A-mRNA. Bei diesen Analysen war jedoch die Sensitivität der RT-PCR herabgesetzt, was auch an schwächeren Banden in der FLNB-RT-PCR messbar war; somit sind diese Ergebnisse mit einem gewissen Vorbehalt zu bewerten. Eine schwache Expression von FLNB-mRNA fiel auch bei den Gewebeproben aus dem HNO-Bereich (Larynx und Tonsille) auf. Diese war entweder auf eine schlechte cDNA-Qualität zurückzuführen, wogegen aber die detektierten Banden in der FAM107A-RT-PCR sprachen. Möglicherweise war FLNB in diesem Gewebe aber auch schwächer exprimiert als in anderen und in diesen Proben deshalb nicht als „Housekeeping“-Gen geeignet. Eine Kontrolle mit z.B. Actin beta erfolgte wegen Materialmangels nicht. Eigene Daten der FAM107AmRNA-Expression in Normal/Tumorprobenpaaren von HNO-Gewebeproben zeigten eine Expression von FAM107A-mRNA in den Normalproben, nicht aber eine in den Tumorproben. Es blieb allerdings ungeklärt, ob es sich bei dem Normalgewebe um umgebendes Normalgewebe handelte oder um z.B. Fibroblasten, die aus dem Tumor herausgewachsen waren. Im Gegensatz zu den eigenen FAM107A-Expressionsdaten zeigten cDNA-Microarray-Analysen eine FAM107A-Expression in Kopf- und Hals-Plattenepithelkarzinomen (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC). Hier fehlten Normalgewebekontrollen, so dass nicht bewertbar war, ob es sich um eine Hoch-, eine Herunterregulation oder auch keine Modulation der FAM107A-Expression handelte (GDS1667) (Slebos et al., 2006).

In zwei mit RT-PCR untersuchten Retinoblastomzelllinienproben war die Expression von FAM107A-mRNA nicht messbar. Auch eine cDNA-Microarray-Analyse zeigte keine FAM07A-Expression in einer nicht weiter beschriebenen Retinoblastomprobe (GDS181, GSM2819) (Su et al., 2002). In vier weiteren untersuchten Retinoblastomzelllinienproben wurde FAM107A-mRNA jedoch eindeutig exprimiert. Inwieweit sich die Retinoblastomzelllinien unterschieden, war nicht bekannt. Von den beiden Retinoblastomzelllinien RB Y79 und RB 247, in denen eine Expression von FAM107A-mRNA nicht messbar war, wurde eine vergleichbare Morphologie berichtet (A. Schramm, Universitätsklinikum Essen, persönliche Mitteilung). Fraglich ist, ob eventuell wie bei den Mammakarzinomen in Abhängigkeit vom Tumorsubtyp eine unterschiedliche Expression von FAM107A messbar ist. Andererseits wird eine Expression von FAM107-mRNA in der Retina beschrieben, wie es in verschiedenen Datenbanken angeführt wird (Wiemann et al., 2001). Ob die Expression in Retinoblastomproben mit dem Tumor als solchem oder dem Gewebe an sich korreliert, kann nicht beurteilt werden.

Insgesamt zeigten die Daten der vorliegenden Arbeit z.T. eine verringerte transkriptionelle Aktivität von FAM107A in unterschiedlichen Tumorgewebeproben. Dies passt zu den Vorstellungen, dass die Transkripte eines „klassischen“ TSG in Tumorgewebe herunterreguliert ist. Andererseits wurde in der vorliegenden Arbeit auch eine Expression von FAM107A in unterschiedlichen Tumorzelllinien gefunden. Dabei wurde häufig eine sporadische Expression von FAM107A beobachtet. Dies deutet auf bislang unbekannte Regulationsmechanismen hin, nach denen das FAM107A-Gen entweder aktiviert oder inaktiviert wird. So könnte das FAM107A-Gen je nach zellulärem Umfeld ähnlich wie z.B. JUNB (Farras et al., 2008) sowohl tumorsuppressive als auch weitere - eventuell onkogene - Eigenschaften haben.

Zur Analyse des Einflusses einer viralen Infektion auf die Expression von FAM107A standen Zelllinien, die frisch infiziert worden waren, zur Verfügung. Humane Vorhautfibroblasten zeigten nach Infektion mit einem CMV-Laborstamm eine mit qualitativer RT-PCR-Analyse gemessene, erhöhte Expression von FAM107A-mRNA. Dies steht im Widerspruch zu cDNA-Microarray-Analysen, die nach Infektion von Humanen Vorhautfibroblasten mit CMV-Laborstamm zunächst im Verlauf von 60min bis 24h zwar eine reduzierte, im Durchschnitt aber innerhalb der Proben vergleichbare Expression zeigten; nach 48h war die Expression deutlich herunterreguliert oder gar nicht mehr messbar (GDS476) (Browne et al., 2001). Der

Zeitpunkt der Ernte der Zellen nach Infektion ist bei den in der eigenen Arbeit verwendeten Vorhautfibroblasten nicht bekannt gewesen. Nach Infektion von Retinazellen mit einem CMV-Patientenstamm wurde in infizierten und nicht-infizierten Zellen eine Expression von FAM107A-mRNA detektiert. Banden in RT(-)-Proben der RT-PCR können auf Kontaminationen, aber auch auf eine Reverse Transkriptase-Aktivität der verwendeten Taq-Polymerase hinweisen (Lyamichev et al., 1999). Diese Aktivität wird bei Puffern mit Mangan beschrieben, das auch in Spuren in den in vorliegender Arbeit verwendeten Puffern enthalten sein kann. Für die Analysen mit Retinazellen wurden keine vergleichbaren cDNA-Microarraydaten gefunden.

Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass die vorliegenden Expressionsdaten keinen Zusammenhang zwischen der Expression von FAM107A-mRNA und einer Virusinfektion aufzeigen konnten.

### **4.3 Genetische und epigenetische Analysen**

Auf die genetische Stabilität des FAM107A-Gens kann die Karyotypisierung der Zelllinien keine Hinweise geben, da die Auflösung bei der G-Bänderung viel zu gering ist. Die klassische Bandanalyse wurde durch Färben mit Giemsa-Färbelösung durchgeführt. Hierbei liegt die Sensitivität in Abhängigkeit von der Qualität der Chromosomenpräparation bei maximal  $10^7$ bp (Schoumans, 2005), was zur Detektion von kleinen FAM107A-Läsionen nicht ausreicht. Veränderungen in 3p wurden z.T. in den in vorliegender Arbeit untersuchten Zelllinien detektiert. Alternativ zur Karyotypisierung könnten FISH-Analysen durchgeführt werden, die spezifische Chromosomenabschnitte in Metaphasen und auch Interphasenkerne nachweisen können (Oliver-Bonet et al., 2006). Des Weiteren können z.B. auch STR-Analysen Hinweise geben. Diese sollten aber vorzugsweise an Tumorgewebeproben durchgeführt werden, da immortale Tumorzelllinien karyotypisch und genetisch instabil sind.

In vorliegender Arbeit wurde als Vorversuch zum Nachweis von FAM107A in genomischer DNA eine qualitative PCR durchgeführt. In den untersuchten Zelllinien ließ sich in dem untersuchten Bereich FAM107A nachweisen. Folglich waren keine homozygoten Deletionen vorhanden, wobei das Vorliegen von heterozygoten Deletionen nicht ausgeschlossen ist. Da nur ein kleiner Teil des FAM107A-Gens überprüft wurde, ist nicht ausgeschlossen, dass ein Bereich distal oder proximal von dem untersuchten Bereich deletiert ist.



Zur Überprüfung, ob Methylierung die Expression von FAM107A-mRNA reguliert, wurde als Assay die Behandlung mit Decitabin gewählt, das zu einer Demethylierung und damit zur Expression methylierungsgehemmter Gene führt. Vorteil dieser Behandlung ist eine einfache Versuchsdurchführung. Nachteil ist, dass eine Änderung im Expressionsverhalten durch die Behandlung mit Decitabin kein Hinweis dafür sein muss, dass das untersuchte Gen selbst methyliert ist. Vielmehr zeigt der Versuch, ob die transkriptionelle Aktivität des untersuchten Gens durch Methylierungen verändert werden kann. Diese Methylierungen können das Gen selbst oder andere Gene, die das zu untersuchende Gen regulieren, betreffen. Als einfacher Marker für die Wirkung von Decitabin auf die Zelllinien wurde die Bestimmung der Zellzahl gewählt, da Decitabin das Wachstum von humanen Tumorzelllinien supprimiert (Bender et al., 1998). Dabei kann die geringere Zellzahl durch toxische Effekte von Decitabin selbst verursacht werden. Zusätzlich kann die Zellzahl durch eine Modulation der transkriptionellen Aktivität proliferationsregulatorischer Gene aufgrund der Demethylierung beeinflusst werden. In den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zeigten nach Behandlung mit Decitabin von den untersuchten Zelllinien nur die RCC-1-Zellen eine vermehrte FAM107A-Expression, in den weiteren untersuchten Zelllinien konnte keine Modulation der FAM107A-Expression festgestellt werden. Die untersuchten RCC-1-Zellen befanden sich zum Zeitpunkt der Analyse in einer sehr hohen Passagenzahl. Möglicherweise wurde dadurch ein höherer Methylierungsgrad bedingt. Diese Vermutung liegt in der Beobachtung begründet, dass in Zelllinien ein höherer Methylierungsgrad als in Primärtumoren gefunden wurde (Antequera et al., 1990; Dammann, 2004). In Glioblastomzelllinien war die Expression von FAM107A nicht durch Decitabin-Behandlung induzierbar (van den Boom et al., 2006). Auch in aus SCID-Tumoren etablierten Tumorzelllinien wurde die FAM107A-mRNA-Expression nicht durch Decitabin-Behandlung induziert (Kholodnyuk et al., 2006). Außerdem muss hier noch einmal darauf hingewiesen werden, dass in den eigenen Analysen nur qualitative RT-PCR-Versuche durchgeführt wurden. Zur genauen Beurteilung der Expression von FAM107A-mRNA in RCC-1-Zellen müsste zum einen eine „junge“ Passage der Zelllinie untersucht werden, zum anderen eine qRT-PCR durchgeführt werden. Weitere spezifische Analysen für Methylierungen sind vonnöten wie zum einen eine CpG-Analyse von Promotorbereichen mit passenden Computerprogrammen. Auf der Basis dieser Ergebnisse kann eine Methylierungs-

spezifische PCR in entsprechenden Promotorbereichen durchgeführt werden (Herman et al., 1996).

Eine mögliche epigenetische Beeinflussung der Expression von FAM107A zeigte sich in der Nierenkarzinomzelllinie RCC-1, nicht aber in der Mammakarzinomzelllinie MCF7, auch nach Behandlung mit dem Histondeazetylase-Inhibitor TSA. Als weiteres steht noch die kombinierte Behandlung von Decitabin und TSA aus, bei der die Chromatinstruktur durch den Histondeazetylase-Hemmer „aufgelockert“ wird und zusätzlich die auch demethylierende Wirkung von TSA durch Decitabin unterstützt wird (Szyf, 2005). Diese Experimente würden eindeutig klären, ob das FAM107-Gen epigenetisch reguliert wird, wie es für ein „klassisches“ TSG als typisch beschrieben wird (Braga et al., 2003).

#### **4.4 Funktionale Analyse von Zelllinien am Beispiel FAM107A-ORF ektopisch exprimierender Zelllinien**

Für die funktionale Analyse des FAM107A-Gens wurden Expressionsvektoren konstruiert, bei denen auf eine Markierung mit einem Protein-Tag verzichtet wurde. Die Aufmerksamkeit in dieser Arbeit war hauptsächlich auf die Wirkung der Expression der nativen (gespleißten) mRNA und deren Analyse gerichtet, nicht hingegen auf die des Proteins. Außerdem kann die Struktur eines Tag das Protein von Interesse und möglicherweise dessen Effekte beeinflussen (Klose et al., 2004). Bei der Herstellung fiel auf, dass abweichend von der Referenzsequenz eine natürliche Variante gefunden wurde mit einem Nukleotidaustausch in der Basenpaarposition 341.

Da diese Base vor dem Startcodon ATG liegt, hat sie sehr wahrscheinlich keine Auswirkung auf das putative Protein. Es kann aber nicht abschließend bewertet werden, ob diese einzelne Base nicht doch Auswirkungen auf Spleißvorgänge oder sonstige Prozesse hat oder ob z.B. regulatorische RNA-Spezies wie microRNA diese als Zielsequenz haben (Bindung von regulatorischen oder stabilisierenden Proteinen). Der FAM107A-1,1-Vektor wurde in der vorliegenden Arbeit nicht für funktionelle Analysen verwendet, lediglich als Basis für die Herstellung des EGFP-Vektors und für eine stabile Transfektion (s.u.). Da der Volllänge-Vektor unter Verwendung des FAM107A-1,1-Vektors hergestellt wurde, enthält auch dieser den Basenaustausch in der Basenpaarposition 341. Weitere Nukleotidaustausche des

Volllänge-Vektors im Vergleich zur Referenzsequenz müssten vor der Anwendung des Vektors in funktionellen Untersuchungen noch abgeklärt werden.

Des Weiteren wurden fluoreszenzmarkierte Vektoren hergestellt, die EGFP exprimierten (Alberts et al., 2002). Mit solchen Vektoren transfizierte Zellen können mit dem Fluoreszenzmikroskop detektiert, durchflusszytometrisch selektiert und so angereichert werden. Von der Expression des EGFP kann man auf die Transfektionseffizienz des vorgeschalteten Gens, in diesem Fall FAM107A, schließen, was aber noch kein Beweis für die Stärke der Expression dieses Gens ist (Flasshove et al., 2000). Die Verwendung einer IRES-Sequenz zwischen den beiden cDNA-Sequenzen erlaubt eine Koexpression einer Vielzahl von Transgenen z.B. in hämatopoetischen Stamm-/Vorläuferzellen. Dabei kann die Höhe der Expression des Transgens von der Position desselben im Verhältnis zur IRES-Sequenz abhängen. (Kleff, 2006; Rattmann et al., 2006). Ein Volllänge-Konstrukt ist als EGFP-Vektor mit dem EGFP-Gen in 3'-Position zur FAM107A-Volllänge-cDNA nicht möglich. Das Polyadenylierungssignal (5'...aataaa...3') für die spezifische Endonuklease würde bewirken, dass die Polyadenylierung am Ende der mRNA von FAM107A erfolgen würde (Lodish et al., 2000), so dass die IRES-EGFP-ORF-Sequenz nicht mehr transkribiert würde. Für einen Volllänge-EGFP-Vektor müsste die Konstruktion des EGFP-Vektors verändert werden mit der FAM107A-Volllänge-cDNA in 3'-Position im Verhältnis zur EGFP-cDNA. Diese fluoreszenzmarkierten Vektoren wurden für Vorversuche mit transienten Transfektionen verwandt, bei denen mit durchflusszytometrischer Analyse schon nach 48h in 50% der Zellen eine EGFP-Expression nicht mehr nachweisbar war (Daten nicht gezeigt). Dies kann möglicherweise durch eine hohe Proliferationsrate der nicht transfizierten Zelllinien bedingt sein; ein Suppressionseffekt der FAM107A-Expression kann aber auch nicht ausgeschlossen werden. Wegen dieser Beobachtung wurden die eigenen Versuche im transienten System auf jeden Fall nicht weiter durchgeführt. Die beiden fluoreszenzmarkierten Vektoren stehen jedoch für zukünftige Transfektionsversuche - vielleicht in anderen Zellsystemen - zur Verfügung.

Die Vektoren FAM107A-ORF und der FAM107A-1,1 wurden in die beiden Nierenzellkarzinomzelllinien RCC-1 und HTB-46 stabil transfiziert. Nierenkarzinomzelllinien wurden verwendet, da das Gen ursprünglich als „downregulated in renal cell carcinoma“ beschrieben wurde (Wang et al., 2000). Speziell an den RCC-1- und den HTB-46-Zellen waren schon Vorversuche

durchgeführt worden, weshalb sie als Zelllinien für die Transfektion gewählt wurden. Beide Linien zeigten jedoch bei späteren Analysen eine große Variabilität im Karyotyp. Dabei ist auch zu bedenken, dass auch einzeln liegende Kolonien methodisch (Ringklonierung) oder biologisch bedingt nicht unbedingt eine monoklonale Linie sein müssen. Zudem erfolgte aus logistischen Gründen keine Reklonierung. Obwohl bei der Herstellung der stabil transfizierten Zelllinien die Anzahl an gewachsenen Kolonien nicht quantitativ ausgewertet wurde, fielen keine großen Unterschiede in der Anzahl der Kolonien zwischen den unterschiedlichen Kulturen auf. Auch morphologisch traten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den nativen und transfizierten Zelllinien auf. Somit führte die ektopische Expression der FAM107-ORF-cDNA in den gegebenen Zellsystemen nicht zu einem anderen äußeren Phänotyp.

Der Vorteil der stabil transfizierten Zelllinien im Gegensatz zu transient transfizierten ist die permanente Expression der FAM107A-cDNA. Transient transfizierte Zellen können den Vektor wieder verlieren oder werden bei der Zellteilung nur an eine Tochterzelle weitergegeben. Nachteil der stabil transfizierten Zelllinien ist die konstitutive Expression, so dass man Effekte nicht genauer kontrollieren kann, was z.B. bei Tetrazyklin-induzierbaren Vektoren möglich ist (Gossen and Bujard, 1992). Zur Kontrolle des Einbaus des Vektors in die DNA wurde mit vektorspezifischen Primern eine PCR an genomischer DNA als Template durchgeführt. Diese ergab bei den mit dem FAM107A-1,1-Vektor transfizierten Zellen keine eindeutig zuzuordnenden Amplifikationsprodukte, weshalb nur die FAM107A-ORF-Transfektanten weiter untersucht wurden. Damit wurde der Schwerpunkt der Analyse auf den Einfluss der proteinkodierenden Sequenz gelegt. Die stabil transfizierte FAM107A-ORF-Sequenz wurde im Genom der Zelllinien mittels Sequenzierung derselben nachgewiesen. Über den Integrationsort in der genomischen DNA lässt sich mit dieser Methode nichts aussagen. Um den Einfluss des Integrationsorts auszuschließen, wurden vier beziehungsweise sechs Kolonien der beiden Zelllinien untersucht (Berry et al., 2006).

Mittels RT-PCR wurde regelmäßig überprüft, ob in den stabil transfizierten Zellen FAM107A-ORF-mRNA exprimiert wurde. Da die Vektoren mit der FAM107A-ORF-Sequenz ohne künstliche Introns hergestellt worden waren, war auch bei diesen RT-PCR die Durchführung von RT(-)-Kontrollen nötig. Die RT-PCR wurde routinemäßig mit FAM107A-ORF-spezifischen Primern durchgeführt, die nicht zwischen

Transfektionsvektor und dem intrinsischen FAM107A-Gentranskript unterscheiden. Deshalb wurde in den Analysen der ersten Passagen die FAM107A-Expression unter Verwendung eines zusätzlichen Primers überprüft, der außerhalb der ORF-Region liegt. Von den sechs RCC-1- beziehungsweise vier HBT-46-Transfektanten, bei denen mittels PCR eine FAM107A-Sequenz im Genom nachweisbar war, exprimierten vier (RCC-1-Linien R03, R08, R09, R012) beziehungsweise zwei (HTB-46-Linien H08, H011) Transfektanten die FAM107A-ORF-mRNA. Entweder beeinflusste die Integrationsstelle die Expression oder aber die Integration der Gensequenz war nur vorübergehend oder unvollständig. Bei vier Zelllinien handelte es sich um überexprimierende Zellen, bei zweien (R08 und R012) um rein ektopisch exprimierende Zellen. Da der Transfektant R08 nach Auftauen nicht mehr anwuchs, was sowohl auf technische Probleme als auch auf proliferations supprimierende Wirkung von FAM107A-ORF hinweisen kann, blieb als „rein“ ektopisch exprimierende Zelllinie R012 übrig. Diese Zelllinie zeigte nach neun Passagen keine FAM107A-Expression mehr, nur die überexprimierenden Zelllinien R03, H08 und H011 waren über 38 Passagen stabil und wurden in weiteren Analysen charakterisiert. Sie werden im weiteren Verlauf als ektopisch exprimierend beschrieben, da die endogene Expression von FAM107A-mRNA nur in einer Reamplifikation nachweisbar war. Dass eine FAM107A-ORF-Expression in manchen Linien nach mehreren Passagen nicht mehr nachweisbar war, spricht dafür, dass diese Linien einem negativen Selektionsdruck gegen die Expression von FAM107A-mRNA unterlagen, was für das FAM107A-Gen als ein TSG spricht. Die Zelllinien R011 und H012 wurden zunächst als Negativkontrollen für nicht exprimierende Zellen mitgeführt.

Die Leervektor-Transfektanten wurden mit einem Primerpaar, dessen Vorwärts-Primer an den putativen Transkriptionsstart im Plasmid bindet, auf eine mögliche mRNA-Expression eines Transkripts des Leervektors selbst überprüft. In der HTB-46-V-Linie wurde in der RT-PCR tatsächlich die zu erwartende Bande von ca. 190bp nachgewiesen, nicht aber in dem RCC-1-V-Transfektanten. Dieses Transkript besitzt kein Startcodon für die Translation. Daher kann man annehmen, dass diese Sequenz kein Protein bildet. Ob das gebildete Transkript eine Bedeutung als kleines RNA-Molekül hatte oder wirklich nur „Basen-Abfallprodukt“ war, konnte bisher in den durchgeführten Analysen nicht geklärt werden.

Da die durchgeführten RT-PCR qualitativer Art waren, konnte keine Aussage über die Expressionsstärke von FAM107A gemacht werden.

In der Literatur wird berichtet, dass nach einer transienten Transfektion von FAM107A-cDNA in Zelllinien eine Suppression der Proliferation dieser Zellen beobachtet wurde. Dies wurde sowohl für die Nierenkarzinomzelllinien HTB-44 und HTB-46 (ATCC) (Wang et al., 2000) als auch an der Bronchialkarzinomzelllinie A549 (ATCC) (Zhao et al., 2007) gezeigt. Die Expression von FAM107A wurde in jenen Analysen nach der transienten Transfektion nicht verifiziert, so dass nicht gewährleistet war, dass die supprimierten Zellen das Gen exprimierten. Bei den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Analysen wurde im Gegensatz zur Volllänge-cDNA bei Wang et al. (2000) die FAM107A-ORF-cDNA für die Transfektion verwendet. Eventuell wurde der Effekt der Proliferationssuppression nicht von der FAM107A-ORF-Sequenz beziehungsweise dem Genprodukt an sich verursacht, sondern war durch 5'- und/oder 3'-Sequenzen vor beziehungsweise hinter der ORF-Sequenz bedingt. Somit müssten in weiteren Versuchen die Proliferationsanalysen mit Vektoren mit der Volllänge-cDNA wiederholt werden. Auf der anderen Seite zeigte die andere Arbeitsgruppe Zhao et al. (2007) eine Proliferationssuppression mit der FAM107A-ORF-cDNA-Sequenz. Dies würde gegen eventuelle regulatorische Elemente außerhalb des ORF-Bereiches sprechen. Des Weiteren ist bemerkenswert, dass der Effekt durch die orthologe Sequenz von *Xenopus laevis* in den humanen Zellen hervorgerufen wurde, was für die hohe Konservierung der funktionellen Aktivität spricht.

Beide Arbeitsgruppen wendeten transiente Transfektionen an. Bei einer stabilen Transfektion werden diejenigen Zellen selektiert, die trotz der Expression des Transgens weiter proliferieren. Selbst wenn die FAM107A-ORF-Sequenz zur Seneszenz führen würde, wie man es von einem „klassischen“ TSG erwarten würde, müssen bei den stabil transfizierten Zelllinien derzeit unbekannte Prozesse zum Überleben der Zellen geführt haben. Das würde bedeuten, dass Tumorzellsysteme, die durch eine stabile Transfektion hergestellt wurden, für Proliferationsanalysen, die eine Suppression veranschaulichen sollen, weniger geeignet sind. Andererseits wurde von anderen stabilen Zellsystemen berichtet wie z.B. der mit FHIT stabil transfizierten pankreatischen Karzinomzelllinie Panc-1, dass eine reduzierte Zellproliferation festgestellt und damit die Eigenschaft von FHIT als TSG veranschaulicht werden konnte (Gopalakrishnan et al., 2003). In Anlehnung an diese Beobachtungen und wegen der eigenen Beobachtungen an transient transfizierten Zellen (s.o.) wurden in der vorliegenden Arbeit stabil transfizierte Zellen hergestellt und analysiert.

Als Surrogatmarker für die Zellproliferation wurde zunächst die Expression von Ki67 analysiert. Die immunzytochemische Analyse von Ki67 zeigte keine Unterschiede in der Proliferation der Zellpopulationen. Zur Absicherung dieses Ergebnisses wurde eine durchflusszytometrische Analyse der Zelllinien mit einem Antikörper gegen Ki67 durchgeführt. Die Unterschiede in der Ki67-Expression waren jedoch so gering, dass auch mit der durchflusszytometrischen Analyse der Ki67-Expression keine wesentlichen Differenzen in der Proliferation gegenüber den nativen Zelllinien detektiert werden konnten. Auch mittels der Zellzyklusanalyse konnten keine substantiellen Unterschiede der Verteilung der Zellen in den Zellzyklusphasen festgestellt werden. Die beiden Einzelversuche der Bestimmung der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbau-Rate zeigten einen großen Unterschied in der Gesamteinbaurate, wobei nicht geklärt werden konnte, welche Ursache für die gesteigerte Einbaurate in einem der Versuche war. Trotzdem konnte festgestellt werden, dass die mit dem Leervektor transfizierten RCC-1- und HTB-46-Zellen eine Proliferationssteigerung und die FAM107A-ORF-Transfektanten bei den RCC-1-Zellen eine Abnahme des Einbaus zeigten, bei den HTB-46-Zellen in den unterschiedlichen Versuchen einmal eine Zunahme und einmal eine Abnahme des  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbaus. Diese diversen Effekte sind wahrscheinlich auf die hohe Heterogenität der Zellen zurückzuführen. Sie können aber auch ein Hinweis darauf sein, dass der FAM107A-ORF-Vektor die proliferationssteigernde Tendenz des Leervektors, deren Ursache ungeklärt ist, in den RCC-1-Zellen zu revertieren vermochte. In den eigenen erstellten Zellzahlkurven der Proliferation über sechs Tage zeigten die mit dem FAM107A-ORF-Vektor transfizierten RCC-1-Zellen zwar im Mittel eine geringere Proliferationsrate, was mit den Ergebnissen des  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbaus korrelierte. Auch fiel die Linie R012, die nach initial nachgewiesener FAM107A-Expression zum Zeitpunkt der Proliferationsanalysen keine FAM107A-Expression mehr zeigte, durch eine geringere Proliferationsrate auf. Insgesamt waren jedoch keine substantiellen Unterschiede in der Proliferationsrate der untersuchten Zelllinien detektierbar. Zur Methode der Bestimmung der Proliferationsrate durch Zählen der Zellzahl muss festgestellt werden, dass eigene Analysen hohe Standardabweichungen aufwiesen, weshalb mögliche kleine Unterschiede der Proliferationsraten möglicherweise nicht gesehen werden konnten. Auch wenn die Gewinnung der Zellzahlkurven standardisiert durchgeführt wurde, waren methodische Schwächen feststellbar: kleine Zellzahlen, das Ausspülen der 6-Loch-Zellkulturplatten. Fraglich ist, ob diese Methode sensitiv genug ist, um schon geringe Proliferationsunterschiede zu detektieren.

Insgesamt muss aus den eigenen Analysen geschlossen werden, dass die ektopische Expression von FAM107A-ORF in den stabil transfizierten RCC-1- und HTB-46-Zellen keinen wesentlichen Einfluss auf die Proliferation der Zellen hatte. Diese Aussage wäre in einem anderen System wie z.B. einem induzierbaren Zellsystem mit einem Tetrazyklin-responsiven Vektor zu überprüfen.

Als Tumorigenitätsmarker wurde in der vorliegenden Arbeit weiterhin das Wachstum und die Koloniebildung in Weichagar untersucht. Entgegen Berichten, dass RCC-1-Zellen nicht in Weichagar wuchsen (Jülicher et al., 1999), konnte in dieser Arbeit das Wachstum von RCC-1- und HTB-46-Zellen in Weichagar nachgewiesen werden. Mit dem Leervektor transfizierte Zellen zeigten eine erhöhte Koloniebildung. Dies zeigte wie auch die Ergebnisse des  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbaus, dass die Proliferation der Zellen nach stabiler Transfektion mit dem Leervektor zunahm. Im Gegensatz dazu wurde diese Proliferationssteigerung nach Transfektion mit dem FAM107A-ORF-Vektor wieder reduziert. Auffällig waren größere Kolonien in den mit FAM107A-ORF-Vektor transfizierten Zellen. Bei diesen stellt sich die Frage, ob das Wachstum in Zellen induziert war, die eventuell eine veränderte Expression von FAM107A zeigten. Die Expression von FAM107A-mRNA konnte in den gewachsenen Kolonien aus logistischen Gründen nicht überprüft werden, so dass keine Aussage getroffen werden kann, ob die vermehrte Proliferation auf FAM107A-exprimierende Zellen oder Revertanten, die keine FAM107A-Expression mehr zeigten, zurückzuführen war. Andererseits könnte die Proliferation der Kolonien auch Beobachtungen bestätigen, nach denen eine starke Expression von FAM107A in invasiven Gliomen zu finden ist (Petrecca et al., 2004; Petrecca et al., 2003). Grundsätzlich fielen in den einzelnen Versuchsansätzen unterschiedliche Proliferationsraten der einzelnen Linien auf, so dass sich hier wieder die Heterogenität der Zellen bemerkbar machen könnte. Aber auch ein Unsicherheitsfaktor in der Versuchsdurchführung, das Ausgießen der warmen Zellsuspensionen, wäre ein technischer Grund, der zu unterschiedlichen Ergebnissen führen könnte. Zwar wurden die Temperaturen regelmäßig überprüft, aber es gab keinen Marker, der die genau gleichen Bedingungen zwischen den einzelnen Ansätzen hätte beweisen können. Die erst später vorgenommene durchflusszytometrische Messung von Survivin zeigte das überraschende Ergebnis, dass die Tumorzelllinien Survivin nur basal exprimierten. Diese Expression von Survivin wurde weder von der ektopischen Expression von FAM107A induziert noch weiter supprimiert. Die basale Expression von Survivin selbst in den nativen Zellen



spricht dafür, dass die Nierenkarzinomzelllinien RCC-1 und HTB-46 zu den weniger aggressiven Karzinomzelllinien gehören. In mehreren Untersuchungen wurde nämlich gezeigt, dass die Expression von Survivin mit der Aggressivität von Nierenzellkarzinomen korreliert (Kosari et al., 2005; Krambeck et al., 2007; Parker et al., 2006). Dass die Nierenkarzinomzelllinien RCC-1 und HTB-46 sich bezüglich einzelner Tumorigenitätsmarker eher wie normale Zellen verhielten, zeigte auch die hohe Expression von HLA-ABC in diesen Zelllinien. In primären Nierenzellkarzinomen wird sonst von einer erniedrigten HLA-ABC-Expression berichtet (Atkins et al., 2004). HLA-DR, das sich normalerweise nur auf B-Lymphozyten, Monozyten oder aktivierten T-Lymphozyten findet, wurde in beiden Zelllinien nicht exprimiert. Untersucht wurde die HLA-DR-Expression, da sie auch bei epidermalen Zellen und verschiedenen Tumorzellen einschließlich Melanomen beobachtet wird (Bröcker et al., 1984). Die ektopische Expression von FAM107A-ORF hatte keinen Einfluss auf die MHC-Antigenexpression HLA-ABC und HLA-DR in den untersuchten Zellsystemen. Vollständigkeitshalber wurde mit Zymografie die Aktivität von an der Invasion beteiligten Proteasen überprüft. Die Protease-Aktivität der Verdauung von Gelatine ist bei den Proteasen MMP-2 und -9 bekannt. Die Zuordnung zu einer bestimmten MMP, nämlich -2 oder -9, beziehungsweise der aktiven und inaktiven Form von MMP-2 war unter den Bedingungen des gewählten Zymografie-Gels nicht möglich. Zur Verifizierung der Proteinprodukte der MMPs käme ein Western-Blot in Frage (Arndt, 2005). In den Kultur-Überständen der mit dem FAM107A-ORF-Vektor transfizierten HTB-46-Zellen, nicht aber in den der RCC-1-Transfektanten, wurde eine verringerte Aktivität von MMP gemessen. Dies würde in dem System der HTB-46-Zellen für eine tumorsuppressive Wirkung von FAM107A sprechen. Weitere Untersuchungen sind jedoch vonnöten, um die Invasionsfähigkeit der Zellen unter dem Einfluss einer Überexpression von FAM107A beurteilen zu können wie z.B. Zellinvasions-Assays.

Abschließend wurde überprüft, ob eine ektopische Expression von FAM107A die Sensitivität der Zellen gegenüber Cisplatin modulieren kann. Vorversuche in der vorliegenden Arbeit hatten gezeigt, dass die Expression von FAM107A selbst nicht durch eine Cisplatinbehandlung moduliert wurde. Während in den RCC-1-Zellen die mit FAM107A-ORF-Vektor transfizierten Zellen eine geringere Absterberate zeigten, wiesen die mit FAM107A-ORF-Vektor transfizierten HTB-46-Zellen eine verstärkte auf. So vermochte offensichtlich die (Über-)Expression von FAM107A-ORF die Sensitivität für Cisplatin in Abhängigkeit von der Zelllinie zu beeinflussen. Wie in den

vorher beschriebenen Versuchen zeigten sich unterschiedliche Effekte in den beiden Zelllinien RCC-1 und HTB-46; jedoch lag auch bei dieser Analyse der Unterschied im Bereich der Standardabweichung. Der Einfluss von Cisplatin auf die Zellen wurde anhand von Zellzyklusanalysen nachgewiesen, die eine Verschiebung des Hauptteils der Zellen in die S- und G<sub>2</sub>/M-Phase zeigten, wobei aber eine Unterscheidung der einzelnen Phasen nicht mehr möglich war. Dies entsprach auch dem Effekt von Cisplatin in anderen Zellsystemen (Bergamo et al., 1999). Der Einfluss von Cisplatin auf die Zellen müsste noch genauer durch Variation der Konzentration und der Einwirkzeit untersucht werden.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse funktioneller *In-vitro*-Analysen mit FAM107A ektopisch exprimierenden RCC-1- und HTB-46-Zelllinien konnten eine tumorsuppressive Aktivität des FAM107A-Gens, wie sie in transienten Transfektionsexperimenten gefunden wurde (Wang et al, 2000; Zhao et al, 2007), nicht eindeutig belegen. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob dies in den verwendeten Zelllinien, die karyotypisch eine hohe Heterogenität und Instabilität zeigten, begründet war. Des weiteren zeigten die Expressionsanalysen von HLA-ABC und Survivin für Tumorzelllinien eher untypische Expressionsmuster. Somit waren diese Zellen eventuell nicht optimal geeignet, um Effekte eines „klassischen“ TSG zu demonstrieren. Es ist jedoch auch zu beachten, dass einige TSG ihre supprimierende Eigenschaft erst *in vivo* zeigen, nicht aber in *In-vitro*-Versuchen, wie es beispielsweise für HYAL1 beschrieben wird (Imreh et al., 2003).

#### 4.5 Ausblick

In weiteren Untersuchungen sollten zunächst funktionelle Analysen in anderen Zellsystemen und mit induzierbaren Vektoren durchgeführt werden. Außerdem sollte *in vivo* die Tumorigenität von FAM107-Transkripten überprüft werden. Weiterhin sollten die Analysen von Genom und Transkriptom auf Proteom und Toponom ausgeweitet werden. Schon jetzt gibt es interessante Hinweise auf Protein-Protein-Interaktionen, die Ausblick auf mögliche Funktionen von FAM107A geben (Ewing et al., 2007; Rual et al., 2005; Schubert et al., 2008).

Abschließend lässt sich sagen, dass die Bedeutung von FAM107A als Zielstruktur für therapeutische Interventionen aufgrund der bis jetzt vorliegenden Untersuchungsergebnisse unklar bleibt.

## 5 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, das auf dem kurzen Arm des humanen Chromosoms 3 (3p) lokalisierte FAM107A-Gen näher zu charakterisieren und eine Funktion als „klassisches“ Tumorsuppressorgen (TSG) zu überprüfen. Dazu wurden Untersuchungen an Primärmaterial von Tumor- und korrespondierendem Normalgewebe sowie an Zellkulturen durchgeführt.

Die Untersuchungen von diversen Gewebeproben und Tumorzelllinien mit qualitativer RT-PCR zeigten z.T. eine verringerte transkriptionelle Aktivität von FAM107A in unterschiedlichen Tumorproben. Eine in vielen Tumorzelllinien sporadisch detektierte Expression von FAM107A deutete auf bislang unbekannte Regulationsmechanismen hin, die möglicherweise in einer zusätzlichen und/oder anderen Funktion als bei der Tumorgenese oder -suppression zu suchen sind. Die Expression von FAM107A-mRNA wurde nicht durch Faktoren wie zirkadiane Rhythmik, Temperatur, Zellzyklus oder Konfluenz in den vorliegenden Zellsystemen beeinflusst. Zusätzlich konnte anhand vorliegender Expressionsdaten kein Zusammenhang zwischen der Expression von FAM107A und einer Virusinfektion aufgezeigt werden.

Durch Karyotypisierung konnte in einzelnen Zelllinien Aneuploidien des Chromosoms 3 und auch Deletionen von 3p nachgewiesen werden. PCR-Voruntersuchungen an genomischer DNA jedoch schlossen homozygote Deletionen in den untersuchten Genabschnitten von FAM107A aus. In der Nierenkarzinomzelllinie RCC-1 zeigte sich eine Heraufregulation der Expression der FAM107A-mRNA sowohl durch Decitabin- als auch durch TSA-Behandlung. Dies stellte aber eine Einzelbeobachtung epigenetischer Beeinflussung dar, die andere Linien nicht zeigten.

Sowohl die Expressionsdaten als auch funktionalen Analysen an den FAM107A-ORF ektopisch exprimierenden Nierenkarzinomzelllinien RCC-1 und HTB-46 konnten eine TSG-Aktivität von FAM107A, wie sie von anderen Gruppen postuliert wurde, in den hier untersuchten Systemen nicht eindeutig belegen. Bei den Analysen fielen Revertanten auf, bei denen die Expression von FAM107A-mRNA verlorengegangen war. Dies könnte als Hinweis auf eine Selektion gegen die FAM107A-Expression sein, was als ein Hinweis auf FAM107A als TSG gewertet werden kann. Diverse Proliferationsanalysen zeigten aber nur entsprechende Tendenzen und dies auch nicht in allen Experimenten. Die Heterogenität der Zelllinien führte dazu, dass keine

statistisch auswertbaren Unterschiede detektierbar waren. Wachstumsanalysen in Weichagar zeigten in den mit FAM107A-ORF-Vektor transfizierten Zellen ein verstärktes Koloniewachstum in der Anzahl und der Größe der Kolonien. Dies sprach für eine invasionsfördernde Wirkung von FAM107A, was aber nicht im Zymografieassay belegt werden konnte. Die Sensitivität der Nierenzellkarzinomzelllinien HTB-46 gegenüber Cisplatin in den mit FAM107A-ORF-Vektor transfizierten Zellen wurde erhöht, nicht aber die der RCC-1-Zellen. Weitere, später untersuchte Surrogatmarker der Tumorigenität wie die Expression von Survivin und HLA-Antigenen zeigten, dass die ausgewählten Testsysteme der nativen RCC-1- und HTB-46-Zellen an sich eine geringere Tumorigenität aufwiesen, die durch eine Überexpression von FAM107A nicht moduliert werden konnte.

Insgesamt ist festzustellen, dass die Funktion von FAM107A als „klassisches“ TSG nicht belegt werden konnte. Dies könnte, wie sich im Verlauf der Arbeit herausstellte, in den in dieser Arbeit verwendeten Zellsystemen begründet sein. Bis jetzt wurden *In-vitro*-Analysen durchgeführt; bei *In-vivo*-Experimenten könnten sich weitere und auch andere Resultate ergeben.

## 6 Tabellenverzeichnis

### 2 Material und Methoden

<i>Tab 2.1</i>	Übersicht über die verwendeten Zelllinien	14
<i>Tab 2.2</i>	Übersicht der Firmen	31
<i>Tab 2.3</i>	Standardprotokoll für die PCR	34
<i>Tab 2.4</i>	Regulatorische Sequenzen der verwendeten Vektoren	39

### 3 Ergebnisse

<i>Tab 3.1</i>	Gegenüberstellung des Karyotyps der Zelllinie MCF7 mit dem Karyotyp dieser Zellen, der in der Datenbank von der DSMZ angegeben wird	56
<i>Tab 3.2</i>	DNA-Profile 8 hochpolymorpher Loci von Short Tandem Repeats (STRs) und des Gens Amelogenin für die Geschlechtsbestimmung	57
<i>Tab 3.3</i>	Zellzyklusanalyse FAM107A-ORF ektopisch exprimierender Zellen	90
<i>Tab 3.4</i>	Anzahl gewachsener Kolonien in Weichagarmedium, Exp. 1 und 2	96
<i>Tab 3.5</i>	Anzahl gewachsener Kolonien in Weichagarmedium, Exp. 3 und 4	98

### 8 Anhang

<i>Tab 8.1</i>	Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit erwähnten Gene	145
<i>Tab 8.2</i>	CDNA-Microarray-Analysen	147
<i>Tab 8.3</i>	Expressionsanalysen mit cDNA-Microarray und Verifizierung mit qRT-PCR	148
<i>Tab 8.4</i>	Weitere Analysen, die FAM107A beschreiben	148
<i>Tab 8.5</i>	Bioinformatische Analysen	150
<i>Tab 8.6</i>	Übersicht über Viren, mit denen Zellen transformiert waren oder infiziert worden waren.	150
<i>Tab 8.7</i>	Übersicht über die in vorliegender Arbeit verwendeten Oligonukleotide	151
<i>Tab 8.8</i>	Spezielle PCR-Protokolle	152
<i>Tab 8.9</i>	Übersicht über die Behandlung der Zelllinien mit Decitabin	153
<i>Tab 8.10</i>	Karyotypen der Zelllinien	153
<i>Tab 8.11</i>	Karyotypen der stabil transfizierten RCC-1- und HTB-46-Zellen	154

## 7 Abbildungsverzeichnis

### 1 Einleitung

<i>Abb 1</i>	Entwicklung eines Normalgewebes zum Primärtumor bis zur Metastase	1
<i>Abb 2</i>	„Two-hit“-Hypothese	3
<i>Abb 3</i>	LUCA-TSG-Region	6
<i>Abb 4</i>	FAM107A-Gen: Transkriptvarianten 1 (oben) und 2 (unten)	7
<i>Abb 5</i>	FAM107A-Genprodukt	8

### 2 Material und Methoden

<i>Abb 6</i>	FAM107A-spezifische Primer	26
<i>Abb 7</i>	Klonierungsstrategie am Beispiel des FAM107A-ORF-Vektors	40
<i>Abb 8</i>	Beispielhafte Darstellung der Cylchredauswertung der HTB-46-Zellen	47

### 3 Ergebnisse

<i>Abb 9</i>	DNA-Profil von MCF7-Zellen	57
<i>Abb 10</i>	Nachweis von FAM107A im Genom diverser Zelllinien	58
<i>Abb 11</i>	Zunahme der Konfluenz der ARPE-19-Zellen über einen Zeitraum von 48h	59
<i>Abb 12</i>	Zunahme der Zellzahl in unbehandelten ARPE-19-Kulturen	60
<i>Abb 13</i>	Zunahme der Zellzahl in ARPE-19-Kulturen nach dem Doppel-Thymidinblock	60
<i>Abb 14</i>	Zellzyklusanalyse der unterschiedlichen Zelllinien über 48h	62
<i>Abb 15</i>	Morphologie der Zellen nach Wachstum für 4 Tage	64
<i>Abb 16</i>	Morphologie der SN12c-, ARPE-19- und HeLa-Zellen nach Hitze-Behandlung	65
<i>Abb 17</i>	RT-PCR-Analyse der FAM107A-mRNA-Expression in Hitze-behandelten ARPE-19- und HeLa-Zellen	66
<i>Abb 18</i>	RT-PCR-Analyse der FAM107A-mRNA-Expression in Hitze-behandelten SN12c-Zellen	67
<i>Abb 19</i>	RT-PCR-Analyse der FAM107A-mRNA-Expression in Normalgewebeproben	68
<i>Abb 20</i>	RT-PCR-Analyse der FAM107A-mRNA-Expression in Tumorzelllinien (1)	69
<i>Abb 21</i>	RT-PCR-Analyse der FAM107A-mRNA-Expression in Tumorzelllinien (2)	69
<i>Abb 22</i>	RT-PCR-Analyse der FAM107A-mRNA-Expression in Larynx- bzw. Oropharynxkarzinomzelllinien	70
<i>Abb 23</i>	RT-PCR-Analyse der FAM107A-mRNA-Expression in den Gewebeproben-Paaren von Kopf- und Halstumoren	71
<i>Abb 24</i>	RT-PCR-Analyse der FAM107A-mRNA-Expression in Retinoblastomzelllinien	71
<i>Abb 25</i>	RT-PCR-Analyse der FAM107A-mRNA-Expression in virusinfizierten HFF-Zellen	72
<i>Abb 26</i>	RT-PCR-Analyse der FAM107A-mRNA-Expression in RPE-Zellen	73
<i>Abb 27</i>	Einfluss einer Decitabinbehandlung auf die Zellzahl am Beispiel der Linie RCC-1	74
<i>Abb 28</i>	Morphologie von Decitabin-behandelten und -unbehandelten RCC-1-Zellen	74
<i>Abb 29</i>	Induktion der Expression von FAM107A-mRNA durch Decitabin-Behandlung in RCC-1-Zellen	75
<i>Abb 30</i>	Morphologie von RCC-1-Zellen nach Behandlung mit TSA	76
<i>Abb 31</i>	Analyse der FAM107A-mRNA-Expression nach Behandlung von RCC-1-Zellen mit TSA	76
<i>Abb 32</i>	Einfluss von Cisplatin auf die Zellzahl in RCC-1- bzw. HTB-46-Zellen	77

<i>Abb 33</i>	Analyse der FAM107A-mRNA-Expression nach Behandlung von RCC-1- und HTB-46-Zellen mit 2µM Cisplatin	78
<i>Abb 34</i>	Schematische Darstellung der Vektoren zur Expression von FAM107A	79
<i>Abb 35</i>	PCR-Nachweis der vektorspezifischen Sequenz in der DNA von RCC-1- und HTB-46-Zellen nach Transfektion	81
<i>Abb 36</i>	Expression von FAM107A-ORF-mRNA in stabil transfizierten Zelllinien	82
<i>Abb 37</i>	Reamplifikation spezifischer FAM107A-cDNA	83
<i>Abb 38</i>	FAM107A-Expressionsanalyse mit dem Primerpaar FAM107A-458+/FAM107A-897- in den stabil transfizierten Zelllinien RCC-1 und HTB-46	83
<i>Abb 39</i>	RT-PCR mit dem Primerpaar pcDNA3.1Zeo(+)-839+/pcDNA3.1Zeo(+)-1031-	84
<i>Abb 40</i>	Morphologie der stabil transfizierten Zelllinien	85
<i>Abb 41</i>	Karyogramme der stabil transfizierten Zelllinien	86
<i>Abb 42</i>	Ki67-Immunzytochemische Analyse der stabil transfizierten HTB-46-Zellen	88
<i>Abb 43</i>	Durchflusszytometrische Analyse der Ki67-Expression in stabil transfizierten RCC-1- und HTB-46-Zellen	89
<i>Abb 44</i>	Messung des <sup>3</sup> H-Thymidin-Einbaus	91
<i>Abb 45</i>	Proliferationskinetik der nativen und stabil transfizierten RCC-1-Zellen durch Zellzahlbestimmung	93
<i>Abb 46</i>	Proliferationskinetik der nativen und stabil transfizierten HTB-46-Zellen durch Zellzahlbestimmung	93
<i>Abb 47</i>	Proliferationskinetik der nativen und stabil transfizierten RCC-1-Zellen durch Zellzahlbestimmung	94
<i>Abb 48</i>	Morphologie von Zellkolonien in Weichagarmedium	97
<i>Abb 49</i>	Expression von Survivin in HTB-46-Zellen [A] und RCC-1-Zellen [B]	99
<i>Abb 50</i>	Anteil Survivin-exprimierender Zellen an der Gesamtzellzahl der jeweils untersuchten Zellen	99
<i>Abb 51</i>	Zymogramm der stabil transfizierten Zelllinien	100
<i>Abb 52</i>	Expression von HLA-DR [A] bzw. HLA-ABC [B] in RCC-1-Zellen	101
<i>Abb 53</i>	Absterberate der Zellen in Prozent nach Cisplatin-Behandlung	102
<i>Abb 54</i>	Zellzyklusanalyse der unbehandelten und der mit Cisplatin behandelten Zelllinien	103

## 8 Anhang

<i>Abb 55</i>	Stammbaum der Spezies, die die Domäne DUF1151 enthalten	155
<i>Abb 56</i>	Morphologie der verwendeten Zelllinien, 1-7	156
<i>Abb 56</i>	Morphologie der verwendeten Zelllinien, 9-16	157
<i>Abb 57</i>	Karyogramme der verwendeten Zelllinien, 1-6	158
<i>Abb 57</i>	Karyogramme der verwendeten Zelllinien, 7-12	159
<i>Abb 57</i>	Karyogramme der verwendeten Zelllinien, 13-16	160
<i>Abb 58</i>	Sequenzabgleich des Inserts des FAM107A-1,1-Vektors (1)	161
<i>Abb 59</i>	Sequenzabgleich des Inserts des FAM107A-1,1-Vektors (2)	162
<i>Abb 60</i>	Sequenzabgleich des Inserts des FAM107A-ORF-Vektors	163
<i>Abb 61</i>	Sequenzabgleich des Inserts des FAM107A-Volllänge-Vektors	164
<i>Abb 62</i>	Sequenzabgleich des Inserts des FAM107A-1,1-IRES-EGFP-Vektors	169
<i>Abb 63</i>	Sequenzabgleich des Inserts des FAM107A-ORF-IRES-EGFP-Vektors	170
<i>Abb 64</i>	Sequenzabgleich des Insertsequenzabschnittes in genomischer DNA von H08	171
<i>Abb 65</i>	Sequenzabgleich eines Sequenzabschnittes genomischer DNA von H011	171
<i>Abb 66</i>	Sequenzabgleich eines Sequenzabschnittes genomischer DNA von R012	172
<i>Abb 67</i>	Sequenz des Vektors pcDNA3.1Zeo(+)-IRES-EGFP	173

---

## Anhang A: Danksagung

Besonderen Dank Herrn Prof. Dr. rer. nat. Bertram Opalka und Herrn PD Dr. med. Mathias Wagner für die Überlassung des Themas, vielseitige Betreuung und stete Hilfsbereitschaft, für die Durchsicht der Arbeit, für die Auszählung bei der immunzytochemischen Ki-67-Analyse

Herrn Dr. rer. nat. Bardenheuer für zahlreiche Ratschläge, für die Auszählung bei der immunzytochemischen Ki-67-Analyse, für die Unterstützung bei der Konstruktion und Herstellung der verwendeten Vektoren und für die Durchsicht der Arbeit

Frau Dr. rer. nat. Michaela Arndt für die freundliche Zurverfügungstellung eines Thermal Cyclers in Krisenzeiten

Frau Dr. rer. nat. Vera Balz für die freundliche Zurverfügungstellung diverser HSCC-cDNA-Proben

Herrn Dr. med. Sebastian Bauer und Frau Heike Löwendick für ihre Ratschläge

Herrn Dr. Dieter Brandhorst für die Systemadministration

Herrn Dr. Helmut Deißler für die freundliche Zurverfügungstellung von HBL100- und ARPE-19-Zellen

Frau Düsselhoff für die tatkräftige Unterstützung bei der freundlichen Zurverfügungstellung sauberer Verbrauchsmaterialien

Herrn Dr. med. Peter Ebeling für die freundliche Zurverfügungstellung von Survivin

Herrn Prof. Dr. Fischer und Herrn Prof. Dr. Holger Sudhoff für die freundliche Zurverfügungstellung von HNO-Gewebeproben

Herrn Dr. Andreas Horschinek für die Einweisung in die Geheimnisse der Molekularbiologie

Herrn PD Dr. F.J. Johannes† für die Einweisung in die cDNA-Microarray-Analyse

Den Damen und Herren des Labors der Allgemeinen und Speziellen Pathologie, Universitätsklinikum des Saarlandes, für die Durchführung der immunzytochemischen Analyse der stabil transfizierten Zelllinien mit Ki-67

Frau PD Dr. med. Monika Lindemann und Labor für die Durchführung der <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau-Analysen

Herrn PD. Dr. Roland Lindner für die Hilfestellung bei mathematischen und statistischen Fragen

Frau Dr. Kerstin Lowinski für die freundliche Zurverfügungstellung von Decitabin und Trichostatin

Herrn Michael Möllmann für jederzeitige Hilfe

Frau Annette Parr für die Durchführung der Karyotypisierungen

Frau Micaela Pantke für die eingehende Durchsicht der vorliegenden Arbeit

Herrn Prof. Dr. G. Ryffel, Frau Sabine Senkel für die freundliche Zurverfügungstellung der Zelllinie ACHN

Herrn Dr. Alexander Schramm und Dipl.Biol. Harald Stephan für die freundliche Zurverfügungstellung von Retinoblastomzelllinien

Herrn PD Dr. Rüdiger Sorg für die freundliche Zurverfügungstellung von DH1- und MG1-Zellen

Herrn Werner Stellberg und Herrn Klaus Lennartz für die fürsorgende Hilfeleistung bei den durchflusszytometrischen Analysen

Herrn Dr. Guido Swart für die freundliche Zurverfügungstellung von BLM-Zellen



Herrn PD Dr. med. Theegarten für die freundliche Zurverfügungstellung einer Probe peribronchialen Drüsenepithels  
Herrn Dr. phil. nat. Jens-Uwe Vogel für die freundliche Zurverfügungstellung von RPE-Zellen, HFF-Zellen, CMV-Laborstamm-infizierte RPE- und HFF-Zellen  
Herrn Ahmed Ragheb Zaher für wissenschaftlichen Austausch  
Frau Bärbel Hülsmann, Herrn Carsten Ludwig, Frau Dr. rer. nat. Ina Rattmann und allen ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Moritz und Arbeitsgruppe Opalka für die muntere Zusammenarbeit  
Frau Dr. rer. nat. Karin Köhler-Hansner, Frau Dr. rer. nat. Uschi Sorg und besonders Frau Dr. rer. nat. Veronika Kleff für Zuspruch und aufklärende Gespräche

**Mein ganzer Dank gilt meinem geliebten Ahmed Hamdy**

## Anhang B: Literatur

- Abravaya, K., Phillips, B. und Morimoto, R. I. (1991). Attenuation of the heat shock response in HeLa cells is mediated by the release of bound heat shock transcription factor and is modulated by changes in growth and in heat shock temperatures. *Genes and Development* 5, 2117-2127.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Walter, P. (2002). *Molecular Biology of THE CELL*, 4. Edition (New York, Garland Science).
- Ancona, N., Maglietta, R., Piepoli, A., D'Addabbo, A., Cotugno, R., Savino, M., Liuni, S., Carella, M., Pesole, G. und Perrei, F. (2006). On the statistical assessment of classifiers using DNA microarray data. *Bioinformatics* 7, 387.
- Andersson, S., Davis, D. L., Dahlback, H., Jornvall, H. und Russell, D. W. (1989). Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. *J Biol Chem* 264, 8222-8229.
- Antequera, F., Boyes, J. und Bird, A. (1990). High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell* 62, 503-514.
- Arndt, M. (2005) Die Expression der Matrix-Metalloproteinase MMP-2 und MMP-9 beim Kolon- und Rektumkarzinom, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen, Inaugural-Dissertation, Aachen.
- Atkins, D., Ferrone, S., Schmahl, G.E., Störkel, S. und Seliger, B. (2004). Down-regulation of HLA class I antigen processing molecules: an immune escape mechanism of renal cell carcinoma? *J Urol* 171, 885-889.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K. (1987-1999). *Current protocols in molecular biology* (New York, Green and Wiley-Interscience).
- Balló, H., Koldovsky, P., Hoffmann, T., Balz, V., Hildebrandt, B., Gerharz, C.D. und Bier, H. (1999). Establishment and characterization of four cell lines derived from human head and neck squamous cell carcinomas for an autologous tumor-fibroblast in vitro model. *Anticancer Res* 19, 3827-3836.
- Banks-Schlegel, S. P., Gazdar, A.F. und Harris, C.C. (1985). Intermediate filament and cross-linked envelope expression in human lung tumor cell lines. *Cancer Res* 45, 1187-1197.
- Barden, C. B., Shister, K.W., Zhu, B., Guiter, G., Greenblatt, D.Y., Zeiger, M.A. und Fahey III, T.J. (2003). Classification of Follicular Thyroid Tumors by Molecular Signature: Results of Gene Profiling. *Clinical Cancer Research* 9, 1792-1800.
- Barrett, T., Troup, D. B., Wilhite, S. E., Ledoux, P., Rudnev, D., Evangelista, C., Kim, I. F., Soboleva, A., Tomashevsky, M. und Edgar, R. (2007). NCBI GEO: Mining tens of millions of expression profiles-database and tools update. *Nucleic Acids Research* 35, D760-D765.
- Becker, N. A., Thorland, E.C., Denison, S.R., Phillips, L.A. und Smith, D.I. (2002). Evidence that instability within the FRA3B region extends four megabases. *Oncogene* 21, 8713-8722.
- Bender, C. M., Pao, M.M. und Jones, P.A. (1998). Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines. *Cancer Res* 58, 95-101.
- Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J. und Wheeler, D. L. (2007). GenBank. *Nucleic Acids Res* 35, D21-25.
- Bergamo, A., Gagliardi, R., Scarcia, V., Furlani, A., Alessio, E., Mestroni, G. und Sava, G. (1999). In vitro Cell Cycle Arrest, In vivo Action on Solid Metastasizing Tumors, and Host Toxicity of the Antimetastatic Drug NAMI-A and Cisplatin. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 289, 559-564.

- Berry, C., Hannenhalli, S., Leipzig, J. und Bushman, F. D. (2006). Selection of Target Sites for Mobile DNA Integration in the Human Genome. *PLoS Computational Biology* 2, 1450-1462.
- Bird, A.P. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321, 209-213.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7(6), 1513-1523.
- Bonetta, L. (2005). The inside scoop-evaluating gene delivery methods. *Nature Methods* 2, 875-883.
- Bos, J. L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49, 4682-4689.
- Bostock, C.J., Prescott, D.M., Kirkpatrick, J.B. (1971). An evaluation of the double thymidine block for synchronizing mammalian cells at the G1-S border. *Exp Cell Res.* 68(1):163-8.
- Braga, E.A., Kashuba, V.I., Maliukova, A.V., Loginov, V.I., Senchenko, V.N., Bazov, I.V., Kiselev, L.L. und Zabarovskii, E.R. (2003). New tumor suppressor genes in hot spots of human chromosome 3: new methods of identification. *Molecular Biology* 37, 170-185.
- Bröcker, E.-B., Suter, L. und Sorg, C. (1984). HLA-DR Antigen Expression in Primary Melanomas of the Skin. *The Journal of Investigative Dermatology* 82, 244-247.
- Browne, E.P., Wing, B., Coleman, D. und Shenk, T. (2001). Altered cellular mRNA levels in human cytomegalovirus-infected fibroblasts: viral block to the accumulation of antiviral mRNAs. *J Virol* 75, 12319-12330.
- Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M. und Croce, C.M. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 2999-3004.
- Carney, D.N., Gazdar, A.F. und Minna, J.D. (1980). Positive correlation between histological tumor involvement and generation of tumour cell colonies in agarose in specimens taken directly from patients with small-cell carcinoma of the lung. *Cancer Research* 40, 1820-1823.
- Caron de Fromentel, C., Nardeux, P.C., Soussi, T., Lavialle, C., Estrade, S., Carloni, G., Chandrasekaran, K. und Cassingena, R. (1985). Epithelial HBL-100 cell line derived from milk of an apparently healthy woman harbours SV40 genetic information. *Exp Cell Res* 160, 83-94.
- Cavenee, W.K., Dryja, T.P., Phillips, R.A., Benedict, W.F., Godbout, R., Gallie, B.L., Murphree, A.L., Strong, L.C. und White, R.L. (1983). Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 305, 779-784.
- Chari, R., Lonergan, K., Girard, L., Minna, J., Gazdar, A., Yao, R., You, M., Ng, R., Lam, W., MacAulay, C. und Lam, S. (2005). Effect of Inhaled Budesonide in Smokers with Bronchial Dysplasia. Poster der BC Cancer Agency.
- Chen, S., Zhu, B. und Yu, L. (2006). In silico comparison of gene expression levels in ten human tumor types reveals candidate genes associated with carcinogenesis. *Cytogenet Genome Res* 112, 53-59.
- Chi, J.T., Chang, H.Y., Haraldsen, G., Jahnsen, F.L., Troyanskaya, O.G., Chang, D.S., Wang, Z., Rockson, S.G., van de Rijn, M., Botstein, D. und Brown, P.O. (2003). Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10623-10628.

- Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechnology* 15, 532-534, 536-537.
- Chong, A., Zhang, Z., Choi, K.P., Choudhary, V., Djamgoz, M.B.A., Zhang, G. und Bajic, V.B. (2007). Promotor profiling and coexpression data analysis identifies 24 novel genes that are coregulated with AMPA receptor genes, GRIAs. *Genomics* 89, 378-384.
- Christmas, P., Jones, J.P., Patten, C.J., Rock, D.A., Zheng, Y., Cheng, S.-M., Weber, B.M., Carlesso, N., Scadden, D.T., Rettie, A.E. und Soberman, R.J. (2001). Alternative Splicing Determines the Function of CYP4F3 by Switching Substrate Specificity. *J Biol Chem* 276, 38166-38172.
- Cinatl, J.J., Blaheta, R., Bittoova, M., Scholz, M., Margraf, St., Vogel, J.-U., Cinatl, J. und Doerr, H.W. (2000). Decreased Neutrophil Adhesion to Human Cytomegalovirus-Infected Retinal Pigment Epithelial Cells Is Mediated by Virus-Induced Up-Regulation of Fas Ligand Independent of Neutrophil Apoptosis. *Journal of Immunology* 165, 4405-4413.
- Cooper, G.M. (2000). *The Cell. A Molecular Approach*, 2. Edition (Sunderland, Massachusetts, ASM Press).
- Daigo, Y., Nishiwaki, T., Kawasoe, T., Tamari, T., Tsuchiya, E. und Nakamura, Y. (1999). Molecular Cloning of a Candidate Tumor Suppressor Gene, DLC1, from Chromosome 3p21.3. *Cancer Research* 59, 1966-1972.
- Dammann, R. H. (2004) Isolation, Charakterisierung und Funktion des Ras Assoziationsdomänen Familie 1 Gens aus dem Tumorsuppressionslocus 3p21.3 mit besonderer Berücksichtigung seiner epigenetischen Inaktivierung in humanen Tumoren, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, Halle-Wittenberg.
- de Kok, J.B., Roelofs, R.W., Giesendorf, B.A., Pennings, J.L., Waas, E.T., Feuth, T., Swinkels, D.W. und Span, P.N. (2005). Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Laboratory Investigation* 85, 154-159.
- Dickopp, A. (2000) Evaluation der Tumorsuppressoraktivität transformationsdefekter Adenovirus-Serotyp 5 E1A-Mutanten, Universität Duisburg-Essen, Inaugural-Dissertation, Essen.
- Dirks, W. G., Fähnrich, S., Estella, I. A. und Drexler, H. G. (2005). Short Tandem Repeat DNA Typing Provides an International Reference Standard for Authentication of Human Cell Lines. *Altex* 22, 103-109.
- Drexler, H.G., Dirks, W.G., Matsuo, Y. und MacLeod, R.A. (2003). False leukemia-lymphoma cell lines: an update on over 500 cell lines. *Leukemia* 17, 416-426.
- Dudaladava, V., Jarzab, M., Stobiecka, E., Chmielik, E., Simek, K., Huzarski, T., Lubinski, J., Pamula, J., Pekala, W., Grzybowska, E. und Lisowska, K. (2006). Gene expression profiling in hereditary, BRCA1-linked breast cancer: preliminary report. *Heredet Cancer Clin Pract* 4, 28-38.
- Dunn, K.C., Aotaki-Keen, A.E., Putkey, F.R. und Hjelmeland L.M. (1996). ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res* 62, 155-169.
- Ebson, M., Anhehn, O., Roder, C. und Morgenroth, K. (2002). Morphology of adenovirus type-3 infection of human respiratory epithelial cells in vitro. *Virchows Arch* 440, 512-518.
- Eschrich, S., Yang, I., Bloom, G., Yin Kwong, K., Boulware, D., Cantor, A., Coppola D., Kruhoffer, M., Aaltonen, L., Ornthoft, T.F., Quackenbush, J. und Yeatman,

- T.J. (2005). Molecular Staging for Survival Prediction of Colorectal Cancer Patients. *J Clin Oncol* 23, 3526-3535.
- Esquela-Kerscher, A. und Slack, F.J. (2006). Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat rev cancer* 6, 259-269.
- Esteller, M. (2005). Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45, 629-656.
- Evans, C.-O., Young, A.N., Brown, M.R., Brat, D.J., Parks, J.S., Neish, A.S. und Oyesiku, N.M. (2001). Novel patterns of gene expression in pituitary adenomas identified by complementary deoxyribonucleic acid microarrays and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Clin Endocrinol Metabolism* 7, 3097-3107.
- Ewing, R.M., Chu, P., Elisma, F., Li, H., Taylor, P., Climie, S., McBroom-Cerajewski, L., Robinson, M.D., O'Connor, L., Li, M., Taylor, R., Dharsee, M., Ho, Y., Heilbut, A., Moore, L., Zhang, S., Ornatsky, O., Bukhman, Y., Ethier, M., Sheng, Y., Vasilescu, J., Abu-Farha, M., Lambert, J.-P., Duewel, H.S., Stewart, I.I., Kuehl, B., Hogue, K., Colwill, K., Gladwish, K., Muskat, B., Kinach, R., Adams, S.-L., Moran, M.F., Morin, G.B., Topaloglou, T. und Figeys, D. (2007). Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. *Mol Syst Biol* 3:89.
- Farras, R., Baldin, V., Gallach, S., Acquaviva, C., Bossis, G., Jariel-Encontre, I. und Piechaczyk, M. (2008). JunB Breakdown in Mid-/Late G2 Is Required for Down-Regulation of Cyclin A2 Levels and Proper Mitosis. *Molecular and Cellular Biology* 28, 4173-4187.
- Fathallah-Shaykh, H.M., He, B., Zhao, L.J., Engelhard, H.H., Cerullo, L., Lichtor, T., Byrne, R., Munoz, L., Von Roenn, K., Rosseau, G.L., Glick, R., Sherman, C. und Farooq, K. (2003). Genomic expression discovery predicts pathways and opposing functions behind phenotypes. *J Biol Chem* 278, 23830-23833.
- Febbo, P.G. und Sellers, W.R. (2003). Use of expression analysis to predict outcome after radical prostatectomy. *J Urol* 170, S11-19, discussion S19-20.
- Feinberg, A.P. und Tycko, B. (2004). The history of cancer epigenetics. *Nature Reviews Cancer* 4, 143-153.
- Finn, R.D., Mistry, J., Schuster-Böckler, B., Griffiths-Jones, S., Hollich, J., Lassmann, T., Moxon, S., Marshall, M., Khanna, A., Durbin, R., Eddy, S.R., Sonnhammer, E.L.L. und Bateman, A. (2006). Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Research* 34, D247-D251.
- Flasshove, M., Bardenheuer, W., Schneider, A., Hirsch, G., Bach, P., Bury, C., Moritz, T., Seeber, S. und Opalka, B. (2000). Type and position of promoter elements in retroviral vectors have substantial effects on the expression level of an enhanced green fluorescent protein reporter gene. *J Cancer Res Clin Oncol* 126, 391-399.
- Fogh, J. (1975). *Human tumor cells in vitro* (New York, Plenum Press).
- Fogh, J., Wright, W.C. und Loveless, J.D. (1977). Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst* 58, 209-214.
- Fogh, J., Fogh, J.M. und Orfeo, T. (1977). One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 59, 221.
- Fogh, J. (1978). Cultivation, characterization, and identification of human tumor cells with emphasis on kidney, testis, and bladder tumors. *Natl Cancer Inst Monogr* 49, 5-9.

- Gaffney, E.V., Pigott, D.A. und Grimaldi, M.A. (1979). Human serum and the growth of human mammary cells. *J Natl Cancer Inst* 63, 913-918.
- Gaugler, B., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P., Romero, P., Gaforio, J.J., De Plaen, E., Lethe, B., Brasseur und F., Boon, T. (1994). Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 179, 921-923.
- Giard, D. J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H. und Parks, W.P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51, 1417-1423.
- Gilliland, G., Perrin, S., Blanchard, K. und Bunn, H.F. (1990). Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 2725-2729.
- Gilsbach, R., Kouta, M., Bonisch, H. und Bruss, M. (2006). Comparison of in vitro and in vivo reference genes for internal standardization of real-time PCR data. *Biotechniques* 40, 173-177.
- Gopalakrishnan, V.K., Banerjee, A.G. und Vishwanatha, J.K. (2003). Effect of FHIT gene replacement on growth, cell cycle and apoptosis in pancreatic cancer cells. *Pancreatology* 3, 293-302.
- Gossen, M. und Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5547-5551.
- Graham, F.L., Smiley, J. Russell, W.C. und Nairn, R. (1977). Characterization of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59.
- Griegel, S., Hong, C., Frotschl, R., Hulser, D.F., Greger, V., Horsthemke, B. und Rajewsky, M.F. (1990). Newly established human retinoblastoma cell lines exhibit an "immortalized" but not an invasive phenotype in vitro. *Int J Cancer* 15, 125-132.
- Gupta, V., Galante, A., Soteropoulos, P., Guo, S. und Wagner, B. J. (2005). Global gene profiling reveals novel glucocorticoid induced changes in gene expression of human lens epithelial cells. *Molec Vision* 11, 1018-1040.
- Hauser, U., Balz, V., Carey, Th.E., Grénman, R., van Lierop, A., Scheckenbach, K. und Bier, H. (2002). Reliable detection of p53 aberrations in squamous cell carcinomas of the head and neck requires transcript analysis of the entire coding region. *Head Neck* 24, 868-873.
- Herman, J.G., Graff, J.R., Myöhänen, S., Nelkin, B.D. und Baylin, S.B. (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9821-9826.
- Hollricher, K. (2007). Die unendliche Sorglosigkeit. *Laborjournal* 6, 30-34.
- Huebner, K., Druck, T., Siprashvili, Z., Croce, C.M., Kovatich, A. und McCue, P.A. (1998). The role of deletions at the FRA3B/FHIT locus in carcinogenesis. *Recent Results Cancer Res* 154, 200-15.
- Huebner, K. (2001). Tumor suppressors on 3p: A neoclassic quartet. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 14763-14765.
- Hughes, P., Marshall, D., Reid, Y., Parkes, H. und Gelber, C. (2007). The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need? *BioTechniques* 43, 575-586.
- Hunter, T. (1997). Oncoprotein Networks. *Cell* 88, 333-346.
- Imreh, S., Klein, G. und Zabarovsky, E.R. (2003). Search For Unknown Tumor-Antagonizing Genes. *Genes, Chromosomes and Cancer* 38, 307-321.

- Irschick, E. U., Sgonc, R., Böck, G., Wolf, H., Fuchs, D., Nussbaumer, W., Gööttinger, W. und Huemer, H. P. (2004). Retinal Pigment Epithelial Phagocytosis and Metabolism Differ from Those of Macrophages. *Ophtalmic Research* 36, 200-210.
- Jiang, F., Yin, Z., Caraway, N.P., Li, R. und Katz, R.L. (2004). Genomic Profiles in Stage I Primary Non Small Cell Lung Cancer Using Comparative Genomic Hybridization Analysis of cDNA Microarrays. *Neoplasia* 6, 623-635.
- Jülicher, K., Vieten, L., Bröcker, F., Bardenheuer, W., Schütte, J. und Opalka, B. (1997). Yeast artificial chromosome transfer into human renal carcinoma cells by spheroplast fusion. *Genomics* 43, 95-98.
- Jülicher, K., Marquitan, G., Werner, N., Bardenheuer, W., Vieten, L., Bröcker, F., Topal, H., Seeber, S., Opalka, B. und Schütte, J. (1999). Novel tumor suppressor locus in human chromosome region 3p14. 2. *J Natl Cancer Inst* 91, 1563-1568.
- Karaman, M.W., Houck, M.L., Chemnick, L.G., Nagpal, S., Chawannakul, D., Sudano, D., Pike, B.L., Ho, V.V., Ryder, O.A. und Hacia, J.G. (2003). Comparative Analysis of Gene-Expression Patterns in Human and African Great Ape Cultured Fibroblasts. *Genome Research* 13, 1619-1630.
- Kent, W.J., Sugnet, C.W., Furey, T.S., Roskin, K.M., Pringle, T.H., Zahler, A.M. und Haussler, D. (2002). The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res* 12, 996-1006.
- Kholodnyuk, I. D., Kozireva, S., Kost-Alimova, M., Kashuba, V., Klein, G. und Imreh, S. (2006). Down regulation of 3p genes , LTF, SLC38A3 and DRR1, upon growth of human chromosome 3-mouse fibrosarcoma hybrids in severe combined immunodeficiency mice. *Int J Cancer* 119, 99-107.
- Kirch, H.C., Ruschen, S., Brockmann, D., Esche, H., Horikawa, I., Barrett, J.C., Opalka, B. und Hengge, U.R. (2002). Tumor-specific activation of hTERT-derived promoters by tumor suppressive E1A-mutants involves recruitment of p300/CBP/HAT and suppression of HDAC-1 and defines a combined tumor targeting and suppression system. *Oncogene* 21, 7991-8000.
- Kiyokawa, N., Yan, D.-H., Brown, M.E. und Hung, M.-C. (1995). Cell cycle-dependent regulation of p185neu: A relationship between disruption of this regulation and transformation. *Proc Natl Acad Sci* 92, 1092-1096.
- Kleff, V. (2006) Korrektur der  $\beta$ c-defizienten Pulmonalen Alveolarproteinose (PAP) durch hämatopoetischen Stammzell-Gentransfer in einm  $\beta$ c-defizienten Mausmodell, Universität Duisburg-Essen, Inaugural-Dissertation, Essen.
- Klose, J., Wendt, N., Sybille, K., Krause, E., Fechner, K., Beyermann, M., Bienert, M., Rudolph, R. und Rothmund, S. (2004). Hexa-histidin tag position influences disulfide structure but not binding behavior of in vitro folded N-terminal domain of rat corticotropin-releasing factor receptor type 2a. *Protein Science* 13, 2470-2475.
- Knudson, A.G.Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 820-823.
- Kochevar, J. (1990). Blockage of autonomous growth of ACHN cells by anti-renal cell carcinoma monoclonal antibody 5F4. *Cancer Res* 50, 2968-2972.
- Kok, K., Naylor, S.L. und Buys, C.H. (1997). Deletions of the short arm of chromosome 3 in solid tumors and the search for suppressor genes. *Adv Cancer Res* 71, 27-92.
- Kosari, F., Parker, A.S., Kube, D.M., Lohse, C.M., Leibovich, B.C., Blute, M.L., Cheville, J.C. und Vasmataz, G. (2005). Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Gene

- Expression Analyses Identify a Potential Signature for Tumor Aggressiveness. *Clin Cancer Res* 11, 5128-5139.
- Krambeck, A.E, Dong, H., Thompson, R.H., Kuntz, S.M., Lohse, C.M., Leibovich, B.C., Blute, M.L., Sebo, T.J., Cheville, J.C., Parker, A.S. und Kwon, E.D. (2007). Survivin and B7-H1 Are Collaborative Predictors of Survival and Represent Potential Therapeutic Targets for Patients with Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 13, 1749-1756.
- Kretz-Remy, C., Munsch, B., und Arrigo, A.-P. (2001). NFkB-dependent Transcriptional Activation during Heat Shock Recovery. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 43723-73733.
- Kumar, M.S., Erkeland, S.J., Pester, R.E., Chen, C.Y., Ebert, M.S., Sharp, P.A. und Jacks, T. (2008). Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. *PNAS* 105, 3903-3908.
- Kumazaki, T., Hiyama, K., Takahashi, T., Omatsu, H., Tanimoto, K., Noguchi, T., Hiyama, E., Mitsui, Y. und Nishiyama, M. (2004). Differential gene expressions during immortalization of normal human fibroblasts and endothelial cells transfected with human telomerase reverse transcriptase gene. *Int J Oncol* 24, 1435-1442.
- Kunitz, M. (1950). Crystalline desoxyribonuclease; isolation and general properties; spectrophotometric method for the measurement of desoxyribonuclease activity. *J Gen Physiol* 33, 349-362.
- Kvasha, S., Gordiyuk, V., Kondratov, A., Ugryn, D., Zgonnyk, Y.M., Rynditch, A.V. und Vozianov, A. F. (2008). Hypermethylation of the 5'CpG island of the FHIT gene in clear cell renal carcinomas. *Cancer Lett* 265, 250-257.
- Kwong, J., Lee, J.-Y., Wong, K.-K., Zhou, X., Wong, D.T.W., Lo, K.-W., Welch, W.R., Berkowitz, R.S. und Mok, S.C. (2006). Candidate Tumor-Suppressor Gene DLEC1 Is Frequently Downregulated by Promoter Hypermethylation and Histone Hypoacetylation in Human Epithelial Ovarian Cancer. *Neoplasia* 8, 268-278.
- Langston, M.A., Baldwin, N.E., Lin, L., Peng, X., Symons, C.T., Zhang, B. und Snoddy, J.R. (2003). A Combinatorial Approach to the Analysis of Differential Gene Expression Data: The Use of Graph Algorithms for Disease Prediction and Screening. Paper presented at: International Conference for the Critical Assessment of Microarray Data Analysis (Durham, North Carolina).
- Lerman, M.I. und Minna, J.D. (2000). The 630-kb Lung Cancer Homozygous Deletion Region on Human Chromosome 3p21.3: Identification and Evaluation of the Resident Candidate Tumor Suppressor Genes. *Cancer Res* 60, 6116-6133.
- Little, C.D., Nau, M.M., Carney, D.N., Gazdar, A.F. und Minna, J.D. (1983). Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature* 306, 194-196.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L.S., Matsudaira, P., Baltimore, D. und Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology*, 4. Edition (New York, Houndsmills, W.H. Freeman and Company).
- Lohmann, D.R., Brandt, B., Passarge, E. und Horsthemke, B. (1997). Molekulare Genetik und Diagnostik des Retinoblastoms Bedeutung für die Ophthalmologische Praxis. *Der Ophthalmologe* 94, 263-267.
- Lott, S.T., Lovell, M., Naylor, S.L. und Mc Neill Killary, A. (1998). Physical and functional mapping of a tumor suppressor locus for renal cell carcinoma within chromosome 3p12. *Cancer Res* 58, 3533-3537.
- Lovell, M., Lott, S.T., Wong, P., El-Naggar, A., Tucker, S. und Killary, A.M. (1999). The genetic locus NRC-1 within chromosome 3p12 mediates tumor suppression



- in renal cell carcinoma independently of histological type, tumor microenvironment, and VHL mutation. *Cancer Res* 59, 2182-2189.
- Lu, Y., Yi, Y., Liu, P., Wen, W., James, M., Wang, D. und You, M. (2007). Common Human Cancer Genes Discovered by Integrated Gene-Expression Analysis. *PLoS ONE* 2, e1149.
- Lupas, A. (1996). Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci* 21, 375-382.
- Lyamichev, V., Brow, M.A.D., Varvel, V.E. und Dahlberg, J.E. (1999). Comparison of the 5' nuclease activities of Taq DNA polymerase and its isolated nuclease domain. *Biochemistry* 96, 6143-6148.
- Macián, F., López-Rodríguez, C. und Rao, A. (2001). Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* 20, 2476-2489.
- Maglott, D., Ostell, J., Pruitt, K.D. und Tatusova, T. (2005). Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Res* 33, D54-D58.
- Marchler-Bauer A, A.J., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hao, L., He, S., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., Krylov, D., Lanczycki, C.J., Liebert, C.A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Song, J.S., Thanki, N., Yamashita, R.A., Yin, J.J., Zhang, D. und Bryant SH (2007). CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res* 35, D237-240.
- McFall, R.C., Sery, T.W. und Makadon, M. (1977). Characterization of a new continuous cell line derived from a human retinoblastoma. *Cancer Res* 37, 1003-1010.
- Meyerhans, A., Vartanian, J.-P. und Wain-Hobson, S. (1990). DNA recombination during PCR. *Nucl Acids Res* 18, 1687-1691.
- Mitelman, F. (1995). ISCN, An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (Basel, Karger Publishers).
- Mülhardt, C. (2002). *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics*, 3. Edition edn (Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag GmbH).
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology* 155, 335-350.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* 24, 17-27.
- Nagase, H., Woessner, J. und Frederick, J. (1999). Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem* 274, 21491-21494.
- Naito, S., von Eschenbach, A.C., Giavazzi, R. und Fidler, I.J. (1986). Growth and metastasis of tumor cells isolated from a human renal cell carcinoma implanted into different organs of nude mice. *Cancer Res* 46, 4109-4115.
- Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N. und Bird A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393, 386-389.
- Negrini, M., Ferracin, M., Sabbioni, S. und Croce, C. M. (2007). MicroRNAs in human cancer: from research to therapy. *J Cell Sci* 120, 1833-1840.
- O'Brien, S.J. (2001). Cell culture forensics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7656–7658.
- Oliver-Bonet, M., Benet, J. und Martin, R. H. (2006). Studying meiosis: a review of FISH and M-FISH techniques used in the analysis of meiotic processes in humans. *Cytogenet Genome Res* 114, 312-318.
- Omenn, G.S., States, D.J., Adamski, M., Blackwell, T.W., Menon, R., Hermjakob, H., Apweiler, R., Haab, B.B., Simpson, R.J., Eddes, J.S., Kapp, E.A., Moritz, R.L., Chan, D.W., Rai, A.J., Admon, A., Aebersold, R., Eng, J., Hancock, W.S., Hefta,

- S.A., Meyer, H., Paik, Y.K., Yoo, J.S., Ping, P., Pounds, J., Adkins, J., Qian, X., Wang, R., Wasinger, V., Wu, C.Y., Zhao, X., Zeng, R., Archakov, A., Tsugita, A., Beer, I., Pandey, A., Pisano, M., Andrews, P., Tammen, H., Speicher, D.W. und Hanash, S.M. (2005). Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. *Proteomics* 5, 3226-3245.
- Orikasa, K., Orikasa, S. und Horii, A. (1998). Identification of a 700-kb region of common allelic loss in chromosome bands 3p14.3-p21.1 in human renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 104, 104-110.
- Ormerod, M.G., Payne, A.W. und Watson, J.V. (1987). Improved program for the analysis of DNA histograms. *Cytometry* 8 (6), 637-641.
- Pankratz, M.T., Li, X.-J., LaVaute, T.M., Lyons, E.A., Chen, X. und Zhang, S.-C. (2007). Directed Neural Differentiation of hESCs via an Obligated Primitive Anterior Stage. *Embryonic Stem Cells* 25 (6), 1511-20.
- Parker, A.S., Kosari, F., Lohse, C.M., Houston, T.R., Kwon, E.D., Murphy, L., Riehle, D.L., Blute, M.L., Leibovich, B.C., Vasmataz, G. und Cheville, J.C. (2006). High expression levels of survivin protein independently predict a poor outcome for patients who undergo surgery for clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* 107, 37-45.
- Petrecce, K., Wang, J., Angers-Loustau, A. und Del Maestro, R.F. (2003). Downregulated in renal cell carcinoma, a tumor suppressor that enhances glioma cell Invasion. Abstract präsentiert bei: „38th MEETING OF THE CANADIAN CONGRESS OF NEUROLOGICAL SCIENCES” (Montreal, Canada).
- Petrecce, K., Angers-Loustau, A., Waldkircher, R., Sadr, M.S., Wang, J. und Del Maestro, R.F. (2004). Downregulated in renal cell carcinoma, a novel effector of glioma invasion. Abstract präsentiert bei: 11th Biannual Canadian Neuro-Oncology Meeting (Toronto, Ontario, Canada, The Canadian Journal of Neurological Sciences).
- Polz, M.F., und Cavanaugh, C.M. (1998). Bias in Template-to-Product Ratios in Multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol* 64, 3724-3730.
- Quellet, V., Zietarska, M., Portelance, L., Lafontaine, J., Madore, J., Puiffe, M.-L., Arcand, S. L., Shen, Z., Hebert, J., Tonin, P.N., Provencher, D.M. und Mes-Masson, A.-M. (2008). Characterization of three new serous epithelial ovarian cancer cell lines. *BMC Cancer* 8, 152, 1-18
- Quentmeier, H., Osborn, M., Reinhardt, J., Zaborski, M. und Drexler, H. G. (2001). Immunocytochemical Analysis of Cell Lines Derived from Solid Tumors. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 49, 1369-1378.
- Rattmann, I., Kleff, V., Sorg, U., Bardenheuer, W., Brueckner, A., Hilger, R.A., Opalka, B., Seeber, S., Flasshove, M. und Moritz, T. (2006). Gene transfer of cytidine deaminase protects myelopoiesis from cytidine analogs in an in vivo murine transplant model. *Blood* 108, 2965-2971.
- Reid, T.W., Albert, D.M., Rabson, A.S., Russell, P., Craft, J., Chu, E.W., Tralka, T.S. und Wilcox, J. L. (1974). Characteristics of an established cell line of retinoblastoma. *J Natl Cancer Inst* 53, 347-360.
- Richards, F.M. (2001). Molecular Pathology of von Hippel-Lindau disease and the VHL tumour suppressor gene. *ExpRev Molecular Medicine*, 1-27.
- Rodenhiser, D.M. und Mann, M. (2006). Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *Canadian Medical Association Journal* 174, 341-348.

- Rozsa, F.W., Reed, D.M., Scott, K.M., Pawar, H., Moroi, S.E., Guckian Kijek, T., Krafchak, C.M., Othman, M.I., Vollrath, D., Elner, V.M. und Richards, J.E. (2006). Gene expression profile of human trabecular meshwork cells in response to long-term dexamethasone exposure. *Molec Vision* 12, 125-141.
- Rual, J.F., Venkatesan, K., Hao, T., Hirozane-Kishikawa, T., Dricot, A., Li, N., Berriz, G.F., Gibbons, F.D., Dreze, M., Ayivi-Guedehoussou, N., Klitgord, N., Simon, C., Boxem, M., Milstein, S., Rosenberg, J., Goldberg, D.S., Zhang, L.V., Wong, S.L., Franklin, G., Li, S., Albala, J.S., Lim, J., Fraughton, C., Llamosas, E., Cevik, S., Bex, C., Lamesch, P., Sikorski, R.S., Vandenhaute, J., Zoghbi, H.Y., Smolyar, A., Bosak, S., Sequerra, R., Doucette-Stamm, L., Cusick, M.E., Hill, D.E., Roth, F.P. und Vidal, M. (2005). Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* 437, 1173-1178.
- Ruutu, M., Johannsson, B., Grenman, R., Syrjänen, K. und Syrjänen, S. (2004). Effect of confluence state and passaging on global cancer gene expression pattern in oral carcinoma cell lines. *Anticancer Res* 24, 2627-2631.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., und Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230 (4732), 1350-1354.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. Edition (Cold Spring Harbor, Laboratory Press).
- Schattka, S., Decken, K., Schmitz-Dräger, B., Ackermann, R. und Ebert, T. (1994). Establishment and characterization of human renal cancer cell lines and autologous normal kidney short term cultures. *Investig Urol* 5, 35-41.
- Scherer, W. F., Syverton, J.T. und Gey, G.O. (1953). Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* 97(5), 695-710.
- Schlüter, C., Duchrow, M., Wohlenberg, C., Becker, M.H.G., Key, G., Flad, H.-D. und Gerdes, J. (1993). The Cell Proliferation-associated Antigen of Antibody Ki-67: a Very Large, Ubiquitous Nuclear Protein with Numerous Repeated Elements, Representing a New Kind of Cell Cycle-maintaining Proteins. *The Journal of Cell Biology* 123, 513-522.
- Schneider-Gadicke, A. und Schwarz, E. (1986). Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. *EMBO J* 5, 2285-2292.
- Schoumans, J. (2005) *Gene Does Imbalances in Children with mental Retardation*, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden.
- Schubert, W., Bode, M., Hillert, R., Krusche, A. und Friedenberger, M. (2008). Toponomics and neurotoponomics: a new way to medical systems biology. *Expert Rev Proteomics* 5, 361-369.
- Seo, J. S., Cho, N.Y., Kim, H.R., Tsurumi, T., Jang, Y.S., Lee, W.K. und Lee, S.K. (2008). Cell cycle arrest and lytic induction of EBV-transformed B lymphoblastoid cells by a histone deacetylase inhibitor, Trichostatin A. *Oncology Reports* 19(1), 93-98.
- Shyamsundar, R., Kim, Y.H., Higgins, J.P., Montgomery, K., Jorden, M., Sethuraman, A., van de Rijn, M., Botstein, D., O Brown, P. und Pollack, J.R. (2005). A DNA microarray survey of gene expression in normal human tissues. *Genome Biol* 6, R22.

- Simpson, J.C., Wellenreuther, R., Poustka, A., Pepperkok, R. und Wiemann, S. (2000). Systematic subcellular localization of novel proteins identified by large-scale cDNA sequencing *EMBO Rep* 1(3):287-92.
- Skubitz, K.M. und Skubitz, A.P. (2003). Differential gene expression in leiomyosarcoma. *Cancer Res* 63, 1029-1038.
- Slamon, D., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A. und Press, M.F. (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244, 707-712.
- Slebos, R. J., Yi, Y., Ely, K., Carter, J., Evjen, A., Zhang, X., Shyr, Y., Murphy, B.M., Cmelak, A.J., Burkey, B.B., Netterville, J.L., Levy, S., Yarbrough, W.G. und Chung, C.H. (2006). Gene expression differences associated with human papillomavirus status in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 12, 701-709.
- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. und Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51, 1409-1416.
- Spira, A., Beane, J., Shah, V., Liu, G., Schembri, F., Yang, X., Palma, J. und Brody, J.S. (2004). Effects of cigarette smoke on the human airway epithelial cell transcriptome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10143-10148.
- Squire, J., Gallie, B.L. und Phillips, R.A. (1985). A detailed analysis of chromosomal changes in heritable and non-heritable retinoblastoma. *Hum Genet* 70, 291-301.
- Stearman, R.S., Dwyer-Nield, L., Zerbe, L., Blaine, S.A., Chan, Z., Bunn, P.A.Jr., Johnson, G.L., Hirsch, F.R., Merrick, D.T., Franklin, W.A., Baron, A.E., Keith, R.L., Nemenoff, R.A., Malkinson, A.M. und Geraci, M.W. (2005). Analysis of orthologous gene expression between human pulmonary adenocarcinoma and a carcinogen-induced murine model. *Am J Pathol* 167, 1763-1775.
- Su, A.I., Cooke, M.P., Ching, K.A., Hakak, Y., Walker, J.R., Wiltshire, T., Orth, A.P., Vega, R.G., Sapinoso, L.M., Moqrich, A., Patapoutian, A., Hampton, G.M., Schultz, P.G. und Hogenesch, J.B. (2002). Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes. *PNAS* 99, 4465 - 4470.
- Sugarman, B.J., Aggarwal, B.B., Hass, P.E., Figari, I.S., Palladino, M.A.Jr. und Shepard, H.M. (1985). Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 230, 943-945.
- Suggs, S.V., Wallace, R.B., Hirose, T., Kawashima, E.H. und Itakura, K. (1981). Use of synthetic oligonucleotides as hybridisation probes: isolation of clones cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proc Natl Acad Sci* 78, 6613.
- Szyf, M. (2005). DNA methylation and demethylation as targets for anticancer therapy. *Biochemistry (Mosc)* 70, 533-549.
- Takahashi, M., Yang, X.J., Lavery, T.T., Furge, K.A., Williams, B.O., Tretiakova, M., Montag, A., Vogelzang, N.J., Re, G.G., Garvin, A.J., Söderhall, St., Kagawa, S., Hazel-Martin, D., Nordenskjöld, A. und Teh, B.T. (2002). Gene expression profiling of favorable histology Wilms tumors and its correlation with clinical features. *Cancer Res* 62, 6598-6605.
- Takahashi, T., Nau, M.M., Chiba, I., Birrer, M.J., Rosenberg, R.K., Vinocour, M., Levitt, M., Pass, H., Gazdar, A.F. und Minna, J.D. (1989). P53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 246, 491.
- Talantov, D., Mazumder, A., Yu, J.X., Briggs, T., Jiang, Y., Backus, J., Atkins, D. und Wang, Y. (2005). Novel genes associated with malignant melanoma but not benign melanocytic lesions. *Clin Cancer Res* 11, 7234-7242.
- Todd, R. und Wong, D.T. (1999). Oncogenes. *Anticancer Res* 19, 4729-4746.

- Ünsal-Kaçmaz, K., Mullen, T. E., Kaufmann, W. K. und Sancar, A. (2005). Coupling of Human Circadian and Cell Cycles by the Timeless Protein. *Mol Cell Biol* 25, 3109-3116.
- Uzonyi, B., Lötzer, K., Jahn, S., Kramer, C., Hildner, M., Bretschneider, E., Radke, D., Beer, M., Vollandt, R., Evans, J.F., Funk, C.D. und Habenicht, A.J. (2006). Cysteinyl leukotriene 2 receptor and protease-activated receptor 1 activate strongly correlated early genes in human endothelial cells. *PNAS* 103, 6326-6331.
- van den Boom, J. (2004) Molekulare Grundlagen der malignen Progression von Gliomen, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- van den Boom, J., Wolter, M., Blaschke, B., Knobbe, Ch.B. und Reifenberger, G. (2006). Identification of novel genes associated with astrocytoma progression using suppression subtractive hybridization and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *International Journal of Cancer* 119, 2330-2338.
- van Muijen, G.N., Jansen, K.F., Cornelissen, I.M., Smeets, D.F., Beck, J.L. und Ruiter, D.J. (1991). Establishment and characterization of a human melanoma cell line (MV3) which is highly metastatic in nude mice. *Int J Cancer* 48, 85.
- van Muijen, G.N., Cornelissen, L.M., Jansen, C.F., Figdor, C.G., Johnson, J.P., Brocker, E.B. und Ruiter, D.J. (1991). Antigen expression of metastasizing and non-metastasizing human melanoma cells xenografted into nude mice. *Clin Exp Metastasis* 9, 259-272.
- Vanaja, D.K., Ballman, K.V., Morlan, B.W., Cheville, J.C., Neumann, R.M., Lieber, M.M., Tindall, D.J., and Young, C.Y. (2006). PDLIM4 repression by hypermethylation as a potential biomarker for prostate cancer. *Clin Cancer Res* 12, 1128-1136.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. und Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3 (7).
- Vázquez-Vega, S., Sánchez-Suárez, P., García-Carrancá, A. und Benítez-Bribiesca, L. (2007). Expression of viral and cellular cycle proteins and proteinases in cervical carcinoma cell lines as possible immunocytochemical markers of malignant phenotype. *BMC Cancer* 7, A21.
- Wagener, C. (1999). Molekulare Onkologie, Bd. 1, 2. Edition (Stuttgart, Georg Thieme Verlag).
- Wain, H.M., Bruford, E.A., Lovering, R.C., Lush, M.J., Wright, M.W. und Povey, S. (2002). Guidelines for Human Gene Nomenclature. *Genomics* 79, 464-470.
- Waldkircher de Oliveira, R., Petrecca, K., Angers-Loustau, A., Seyed-Sadr, M., Del Maestro, R. (2005). PROMOTION OF MALIGNANT GLIAL CELL POLARITY AND INVASION BY DRR-1. Abstract präsentiert bei: World Federation of Neuro-Oncology Second Quadrennial Meeting and the Sixth Meeting of the European Association for Neuro-Oncology (Edinburgh, United Kingdom, Neuro-oncol).
- Wallrapp, C., Hähnel, S., Boeck, W., Soder, A., Mincheva, A., Lichter, P., Leder, G., Gansauge, F., Sorio, C., Scarpa, A. und Gress, T. M. (2000). Loss of the Y chromosome is a frequent chromosomal imbalance in pancreatic cancer and allows differentiation to chronic pancreatitis. *International Journal of Cancer* 91, 340-344.
- Wang, H., Huang, S., Shou, J., Su, E.W., Onyia, J.E., Liao, B. und Li, S. (2006). Comparative analysis and integrative classification of NCI60 cell lines and primary tumors using gene expression profiling data. *BMC Genomics* 7:166.

- Wang, L., Darling, J., Zhang, J.S., Liu, W., Qian, J., Bostwick, D., Hartmann, L., Jenkins, R., Bardenhauer, W., Schutte, J., Opalka, B. und Smith, D.I. (2000). Loss of expression of the DRR 1 gene at chromosomal segment 3p21.1 in renal cell carcinoma. *Genes, Chromosomes and Cancer* 27, 1-10.
- Wang, L., and Adamo, M. L. (2000). Cell Density Influences Insulin-Like growth Factor I Gene Expression in a Cell Type-Specific Manner. *Endocrinology* 141, 2481-2489.
- Watson, J.V., Chambers, S.H. und Smith, P.J. (1987). A pragmatic approach to the analysis of DNA histograms with a definable G1 peak. *Cytometry* 8(1), 1-8.
- Wenger, S., Senft, J., Sargent, L., Bamezai, R., Bairwa, N. und Grant, S. (2004). Comparison of Established Cell Lines at Different Passages by Karyotype and Comparative Genomic Hybridization. *Bioscience Reports* 24, 631-639.
- Werner, N.S., Siprashvili, Z., Fong, L.Y., Marquitan, G., Schroder, J.K., Bardenheuer, W., Seeber, S., Huebner, K., Schütte, J. und Opalka, B. (2000). Differential susceptibility of renal carcinoma cell lines to tumor suppression by exogenous Fhit expression. *Cancer Res* 60, 2780-2785.
- Wheeler, D.L., Chappey, C., Lash, A.E., Leipe, D.D., Madden, T.L., Schuler, G.D., Tatusova, T.A. und Rapp, B.A. (2000). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 28, 15-18.
- Whitfield, M.L., Sherlock, G., Saldanha, A.J., Murray, J.I., Ball, C.A., Alexander, K.E., Matese, J.C., Perou, C.M., Hurt, M.M., Brown, P.O. und Botstein, D. (2002). Identification of Genes Periodically Expressed in the Human Cell Cycle and Their Expression in Tumors. *Molecular biology of the cell* 13(6), 1977-2000.
- WHO (2000). International Classification of Diseases for Oncology, ICD-O-3, 3. Edition (Albany, WHO Publications Center USA).
- Wicha, M.S., Liu, S. und Dontu, G. (2006). Cancer Stem Cells: An Old Idea--A Paradigm Shift. *Cancer Res* 66, 1883-1890.
- Wiemann, S., Weil, B., Wellenreuther, R., Gassenhuber, J., Glassl, S., Ansorge, W., Böcher, M., Blöcker, H., Bauersachs, S., Blum, H., Lauber, J., Dusterhöft, A., Beyer, A., Köhrer, K., Strack, N., Mewes, H.W., Ottenwälder, B., Obermaier, B., Tampe, J., Heubner, D., Wambutt, R., Korn, B., Klein, M. und Poustka, A. (2001). Toward a catalog of human genes and proteins: sequencing and analysis of 500 novel complete protein coding human cDNAs. *Genome Research* 11, 422-435.
- Williams, R., Peisajovich, S.G., Miller, O.J., Magdassi, S., Tawfik, D.S. und Griffiths, A.D. (2006). Amplification of complex gene libraries by emulsion PCR. *Nat Methods* 3, 545-550.
- Wissmann, C. (2002) Identifizierung differentiell exprimierter Gene in Tumoren der Prostata und Harnblase, Freie Universität Berlin, Berlin.
- Yamato, T., Orikasa, K., Fukushige, S., Orikasa, S. und Horii, A (1999). Isolation and characterization of the novel gene, TU3A, in a commonly deleted region on 3p14.3p14.2 in renal cell carcinoma. *Cytogenet Cell Genet* 87, 291-295.
- Yokota, J. (2000). Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis* 21, 497-503.
- Zabarovsky, E.R., Lerman, M.I. und Minna, J.D. (2002). Tumor suppressor genes on chromosome 3p involved in the pathogenesis of lung and other cancers. *Oncogene* 21, 6915-6935.
- Zhao, X.Y., Liang, S.F., Yao, S.H., Ma, F.X., Hu, Z.G., Yan, F., Yuan, Z., Ruan, X.Z., Yang, H.S., Zhou, Q. und Wei, Y.Q. (2007). Identification and preliminary function study of *Xenopus laevis* DRR1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 361, 74-78.

- Zhao, X.-Y., Li, H.-X., Liang, S.-F., Yuan, Z., Yan, F., Ruan, X.-Z., You, J., Xiong, S.-Q., Tang, M.-H. und Wei, Y.-Q. (2008). Soluble Expression of Human Down-regulated in Renal Cell Carcinoma 1 (DRR1) in *Escherichia coli* and Preparation of Its Polyclonal Antibodies. *Biotechnol Appl Biochem* 49, 17-23.
- Zheng, Y., Ye, L. B., Liu, J., Jing, W., Timani, K. A., Yang, X. J., Yang, F., Wang, W., Gao, B. und Wu, Z. H. (2005). Gene expression profiles of HeLa Cells impacted by hepatitis C virus non-structural protein NS4B. *J Biochem Mol Biol* 38, 151-160.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. und Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7, 203-214.
- Zhao, X.Y., Liang, S.F., Yao, S.H., Ma, F.X., Hu, Z.G., Yan, F., Yuan, Z., Ruan, X.Z., Yang, H.S., Zhou, Q. und Wei, Y.Q. (2007). Identification and preliminary function study of *Xenopus laevis* DRR1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 361, 74-78.
- Zhao, X.-Y., Li, H.-X., Liang, S.-F., Yuan, Z., Yan, F., Ruan, X.-Z., You, J., Xiong, S.-Q., Tang, M.-H. und Wei, Y.-Q. (2008). Soluble Expression of Human Down-regulated in Renal Cell Carcinoma 1 (DRR1) in *Escherichia coli* and Preparation of Its Polyclonal Antibodies. *Biotechnol Appl Biochem* 49, 17-23.
- Zou, C.-P., Youssef, E.M., Zou, C.-C., Carey, T.E. und Lotan, R. (2001). Differential effects of chromosome 3p deletion on the expression of the putative tumor suppressor RAR and on retinoid resistance in human squamous carcinoma cells. *Oncogene* 20, 6820-6827.

## Anhang C, Tabellen 8.1-8.11

**Tab 8.1: Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit erwähnten Gene.** Die Einordnung erfolgte nach der Datenbank NCBI, Entrez Gene (Maglott et al., 2005), Datum des Abgleichs mit der Datenbank 17.08.2008. Einzelne in der Arbeit verwendeten Genbezeichnungen entsprechen nicht dem offiziellen Symbol nach Entrez Gene. In diesen Fällen sind die verwendeten Bezeichnungen dick gedruckt.

Gen	Synonyme	Gene ID	Chromosom	Spezies	Taxonomy ID
18S rRNA	18S ribosomal RNA; LOC100008588	100008588	21, Un	Homo sapiens	9606
ACTB	<b>actin, beta</b>	60	7p15-p12	Homo sapiens	9606
AMELX	<b>amelogenin</b> (amelogenesis imperfecta 1, X-linked); AMG; AIH1; ALGN; AMGL; AMGX	265	Xp22.31-p22.1	Homo sapiens	9606
BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5; API4; EPR-1; <b>Survivin</b>	332	17q25	Homo sapiens	9606
CSF1R	colony stimulating factor 1 receptor; FMS; CSFR; FIM2; C-FMS; CD115; <b>CSF1PO</b>	1436	5q33-q35	Homo sapiens	9606
DLEC1	deleted in lung and esophageal cancer 1; F56; DLC1	9940	3p22-p21.3	Homo sapiens	9606
Drr1	developmentally regulated repeat element-containing transcript 1; Drr1a; Drr1b; Drr1c	13499	X	Mus musculus	10090
DDR1	TOR1; PIK-related protein kinase and rapamycin target; subunit of TORC1, a complex that controls growth in response to nutrients by regulating translation, transcription, ribosome biogenesis, nutrient transport and autophagy; involved in meiosis	853529	X	Saccharomyces cerevisiae	4932
ERBB2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian); NEU; NGL; HER2; TKR1; CD340; HER-2; c-erb B2; <b>HER-2/neu</b>	2064	17q11.2-q12, 17q21	Homo sapiens	9606
FAM107A	family with sequence similarity 107, member A; DRR1; TU3A; FLJ30158; FLJ45473	11170	3p21.1	Homo sapiens	9606
FAM107A	downregulated in renal cell carcinoma FAM107A	747580	3	Pan troglodytes	9598
FAM107B	Family with sequence similarity 107, member B; C10orf45; FLJ45505; MGC11034; MGC90261	83641	10p13	Homo sapiens	9606
FHIT	fragile histidine triad gene; FRA3B; AP3Aase	2272	3p14.2	Homo sapiens	9606
FLNB	filamin B, beta (actin binding protein 278); AOI; FH1; SCT; TAP; LRS1; TAPP; FLN1L; ABP-278; filamin B; DKFZp686O033; DKFZp686A1668	2317	3p14.3	Homo sapiens	9606
GADD45G	growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma; CR6, DDIT2, GRP17, GADD45gamma	10912	9q22.1-q22.2	Homo sapiens	9606
GATA1	GATA binding protein 1 (globin transcription factor 1); GF1; GF-1; NFE1; ERYF1	2623	Xp11.23	Homo sapiens	9606
GRIA1	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 1; GLUH1; GLUR1; GLURA; HBGR1; MGC133252	2890	5q33; 5q31.1	Homo sapiens	9606
GRIA2	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 2; GLUR2; GLURB; HBGR2; GluR-K2	2891	4q32-q33	Homo sapiens	9606
GRIA3	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 3; GLUR3; GLURC; MRX94; GLUR-C; GLUR-K3	2892	Xq25-q26	Homo sapiens	9606
GRIA4	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 4, GLUR4, GLURD, GLUR4C	2893	11q22	Homo sapiens	9606
HLA-DRA	major histocompatibility complex, class II, DR alpha; HLA-DRA1	3122	6p21.3	Homo sapiens	9606
HLA-DRB1	major histocompatibility complex, class II; DRB1; HLA-DRB1; HLA-DR1B; HLA-DRB1*	3123	6p21.3	Homo sapiens	9606
HRAS	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog, CTLO; HAMS; HRAS1; K-RAS; N-RAS; RASH1; C-H-RAS; H-RASID; C-BAS/HAS; C-HA-RAS1	3265	11p15.5	Homo sapiens	9606



Gen	Synonyme	Gene ID	Chromosom	Spezies	Taxonomy ID
HSP90AA1	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1; HSPN; LAP2; HSP86; HSPC1; HSPCA; Hsp89; Hsp90; <b>HSP89A</b> ; HSP90A; HSP90N; HSPCAL1; HSPCAL4; FLJ31884	3320	14q32.33	Homo sapiens	9606
HSPA4	heat shock 70kDa protein 4; RY; APG-2; <b>hsp70</b> ; hsp70RY; HS24/P52; MGC131852	3308	5q31.1-q31.2	Homo sapiens	9606
HSPD1	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin); CPN60; GROEL; <b>HSP60</b> ; HSP65; SPG13; HuCHA60	3329	2q33.1	Homo sapiens	9606
IL6	interleukin 6 (interferon, beta 2); HGF; <b>HSF</b> ; BSF2; IL-6; IFNB2	3569	7p21	Homo sapiens	9606
JUNB	jun B proto-oncogene; AP-1	3726	19p13.2	Homo sapiens	9606
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, NS3; KRAS1; KRAS2; RASK2; KI-RAS; C-K-RAS; K-RAS2A; K-RAS2B; K-RAS4A; K-RAS4B	3845	12p12.1	Homo sapiens	9606
MAP1A	microtubule-associated protein 1A; MAP1L; MTAP1A; FLJ77111	4130	15q13-qter	Homo sapiens	9606
MIRN135A1	microRNA <b>135a-1</b> ; MIRN135-1	406925	3p21.1	Homo sapiens	9606
MIRNLET7G	microRNA <b>let-7g</b> ; LET7G; MIRLET7G; hsa-let-7g	406890	3p21.1	Homo sapiens	9606
MKI67	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67; KIA; Ki-67; <b>Ki67/Mib1</b>	4288	10q25-qter	Homo sapiens	9606
MMP-2	matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase); CLG4; MONA; CLG4A; TBE-1; MMP-II	4313	16q13-q21	Homo sapiens	9606
MMP-9	matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase); GELB; CLG4B; MMP9	4318	20q11.2-q13.1	Homo sapiens	9606
NRAS	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog ; ALPS4; N-ras; NRAS1	4893	1p13.2	Homo sapiens	9606
RASSF1	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 1; 123F2; RDA32; NORE2A; RASSF1A; REH3P21	11186	3p21.3	Homo sapiens	9606
RB1	retinoblastoma 1; RB; pRb; OSRC; pp110; p105-Rb	5925	13q14.2	Homo sapiens	9606
ST18	suppression of tumorigenicity 18 (breast carcinoma) (zinc finger protein); ZNF387; KIAA0535	9705	8q11.23	Homo sapiens	9606
TH	tyrosine hydroxylase; TYH; <b>THO1</b>	7054	11p15.5	Homo sapiens	9606
TPO	thyroid peroxidase; <b>TPOX</b> ; MSA; TPX	7173	2p25	Homo sapiens	9606
VHL	von Hippel-Lindau tumor suppressor; RCA1; VHL1; HRCA1	7428	3p26-p25	Homo sapiens	9606
VWF	von Willebrand factor; VWD; F8VWF; <b>vWA</b>	12p13.3	7450	Homo sapiens	9606

**Tab 8.2: CDNA-Microarray-Analysen** und andere Analysen, bei denen eine differenzielle Regulation von FAM107A beschrieben wird.

Autor	Zellen bzw. Gewebe	Lokalisation	ICDO-3-Code (Morphologie)	ICDO-3-Code (Topografie)	Ergebnis: Expression von FAM107A
(Ancona et al., 2006)	Adenokarzinom	Kolon	8140/3	C18.9	Herunterregulation
(Barden et al., 2003)	Follikuläres Karzinom	Schilddrüse	8330/3	C73.9	Hochregulation gegenüber follikulären Schilddrüsenadenomen
(Browne et al., 2001)	Fibroblasten	Präputium	Entfällt	C60.0	48h nach Infektion mit HCMV Herunterregulation
(Chari et al., 2005)	Epithelzellen (bei Rauchern)	Bronchus	Entfällt	C34.9	Hochregulation (bei völligem oder teilweisen Ansprechen auf die Therapie), nach 6-monatiger Behandlung mit inhalativem 1600µg Budesonid (CAS-Nr 51333-22-3)
(Chi et al., 2003)	Endothelzellen (Vene)	Intestinale und Nasale Polypen EC	Entfällt	C11.9 C17.9	Marker im Vergleich zu arteriellen Endothelzellen
(Dudalada et al., 2006)	Adenokarzinom	Mamma	8140/3 8500/3 8520/3	C50.9	Hochregulation (insgesamt 22 Probesets versus 78 herunterregulierten Probesets) im Vergleich zu sporadischen Mammakarzinomen
(Eschrich et al., 2005)	Adenokarzinom	Kolon	8140/3	C18.9	Hochregulation bei guter Überlebensprognose
(Evans et al., 2001)	Hypophysenadenom	Hypophyse	8272/0	C75.1	Herunterregulation versus normalen Hypophysen, „nonfunctioning“ Hypophysenadenomen und sekretierenden Hypophysenadenomen wie PRL-Adenomen (Prolaktin sekretierende) und ACTH-sekretierenden Hypophysenadenomen
(Fathallah-Shaykh et al., 2003)	Meningeom	Meningen	9530/0	C70.9	Herunterregulation
(Febbo und Sellers, 2003)	Adenokarzinom (Gleason Grad 6-7)	Prostata	8140/3	C61.9	Herunterregulation
(Gupta et al., 2005)	Linsenepithelzelllinie	Auge	Entfällt	C69.4	Hochregulation, nach Cortisonbehandlung (16h 1µM Dexamethason, CAS-Nr 50-02-2; nicht bei der Kurzbehandlung von 4h)
(Karaman et al., 2003)	Fibroblasten, Homo sapiens, Pan paniscus und Gorilla gorilla	Entfällt	Entfällt	C80.9	vorhanden
(Kumazaki et al., 2004)	Neonatale Humane Diploide Fibroblasten MJ90	Entfällt	Entfällt	C80.9	Herunterregulation in mit humaner Telomerase Reverser Transkriptase (hTERT) transfizierten Zellen
(Pankratz et al., 2007)	Humane Embryonale Stammzellen H9 und H1	Entfällt	Entfällt	C80.9	Hochregulation nach 17 Tagen bei neuroektodermaler Differenzierung, nach Tag 0, 6, 10 und 17 (nach neuroektodermaler Differenzierung)
(Rozsa et al., 2006)	Trabekelwerkzelllinie (HTM)	Auge	Entfällt	C69.4	Hochregulation nach Cortisonbehandlung (21 Tage 100nM Dexamethason, CAS-Nr 50-02-2)
(Shyamsundar et al., 2005)	Diverse Gewebeproben	Gehirn (u.a.)	Entfällt	C71.9	gewebetypisches Gen

Autor	Zellen bzw. Gewebe	Lokalisation	ICDO-3-Code (Morphologie)	ICDO-3-Code (Topografie)	Ergebnis: Expression von FAM107A
(Skubitz und Skubitz, 2003)	Leiomyosarkom	Uterus	8890/3	C55.9	Herunterregulation gegenüber normalem Myometrium
(Slebos et al., 2006)	Plattenepithelkarzinome	Larynx, Pharynx	8070/3	C32.1	vorhanden
(Stearman et al., 2005)	Adenokarzinom	Respirationstrakt	8140/3	C34.9	Herunterregulation
(Su et al., 2002)	Retinoblastomzellen	Retina	9510/3	C69.2	Herunterregulation
(Takahashi et al., 2002)	Wilms Tumor	Niere	8960/3	C64.9	Hochregulation bei schlechter Prognose
(Talantov et al., 2005)	Haut, benigne Haut-Naevi, primäre maligne Melanome	Haut	8720/3	C44.9	Hochregulation in normaler Haut
(Uzonyi et al., 2006)	HUVEC	Nabelschnurvene	Entfällt	Entfällt	<b>[a]</b> Hochregulation, nach 100nM LTD4 für eine Stunde <b>[b]</b> Hochregulation, nach 100nM LTD4 zusammen mit 10nM Thrombin für eine Stunde <b>[c]</b> keine Regulation, mit Thrombin alleine bzw. nach 6h oder 24h Behandlung mit LTD4
(Wissmann, 2002)	Adenokarzinom (Gleason Grad 4-9)	Prostata	8140/3	C61.9	Herunterregulation (unabhängig vom Gleason Grad, 4-9) versus Normalgewebe derselben Patienten
(Zheng et al., 2005)	Adenokarzinomzelllinie (HeLa)	Zervix uteri	8140/3	C53.9	Herunterregulation in transfizierten Zellen nach stabiler Transfektion mit Hepatitis C-Virusprotein nicht-strukturellem 4B (HCV-NS4B)

**Tab 8.3: Expressionsanalysen mit cDNA-Microarray und Verifizierung mit qRT-PCR.**

Autor	Zellen bzw. Gewebe	Lokalisation	ICDO-3-Code (Morphologie)	ICDO-3-Code (Topografie)	Ergebnis: Expression von FAM107A
(Spira et al., 2004)	Epithelzellen (bei Rauchern)	Bronchus	Entfällt	C34.9	Am stärksten herunterreguliertes Gen (um den Faktor 4, $p < 1,06 \times 10^{-5}$ ) unter insgesamt 97 Genen mit differenzieller Expression
(Vanaja et al., 2006)	Adenokarzinom	Prostata	8140/3	C61.9	Herunterregulation, Zunahme der Herunterregulation mit höherem Gleason Grad

**Tab 8.4: Weitere Analysen, die FAM107A beschreiben**

Autor	Art der Analyse	Zellen bzw. Gewebe	Lokalisation	ICDO-3-Code (Morphologie)	ICDO-3-Code (Topografie)	Ergebnis
(Jiang et al., 2004)	CGH Analyse mit cDNA-Microarrays (14 nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen: 6 SQCA, 8 ADCA)	Plattenepithelkarzinom, Adenokarzinom	Respirationstrakt	8070/3 8140/3	C34.9	Reduktion der Kopienzahl von FAM107A in 11 von 14 Fällen (79%)

Autor	Art der Analyse	Zellen bzw. Gewebe	Lokalisation	ICDO-3-Code (Morphologie)	ICDO-3-Code (Topografie)	Ergebnis
(Kholodnyuk et al., 2006)	qRT-PCR an Humane Chromosom 3-Maus-Fibrosarkoma-A9-MCH	Entfällt	Entfällt	Entfällt	Entfällt	Herunterregulation von FAM107A-mRNA in 2 von 9 „chr3+“ Tumoren und in 7 Expression verloren
(Petrecca et al., 2003)	<b>[a]</b> 3D-Tumormodell von Gliomen <b>[b]</b> Immun-histochemische Analyse	Gliom	Gehirn	9381/3	C71.9	<b>[a]</b> Überexpression von FAM107A fördert die Invasion, geringe Expression in normalen Hirn und nichtinvasiven Gliomen, in invasiven hohe <b>[b]</b> Kolokalisation von FAM107A mit Actin, MAP1A als interagierendes Protein mit FAM107A
(van den Boom et al., 2006)	<b>[a]</b> Subtraktionshybridisierung (SSH) <b>[b]</b> qRT-PCR (in denselben Proben und sieben weiteren Probenpaaren) <b>[c]</b> Decitabin/Trichostatin Behandlung von Glioblastom-zelllinien	Gliom Glioblastom	Gehirn	9381/3 9400/3 9440/3	C71.9	<b>[a]</b> Herunterregulation in drei von vier Gliompaaren (Primärtumor, Gliom WHO Grad II versus Rezidiv-glioblastom, Gliom WHO Grad IV) <b>[b]</b> differenzielle Expression in 3/3 und 5 von 7 Tumorpaaren, Herunterregulation in sekundären/ signifikant ( $p < 0,0001$ ) niedrigere Expression in Glioblastomen versus diffusen Astrozytomen <b>[c]</b> keine Auswirkung auf Expression von FAM107A
(Wang et al., 2000)	<b>[a]</b> Northern-Blot <b>[b]</b> RT-PCR <b>[c]</b> Transfektion von FAM107A in eine Nierenkarzinom-zelllinie <b>[d]</b> DHPLC für Screening nach Mutationen in den RT-PCR Produkten <b>[e]</b> <i>In-vitro</i> -Translation nach Herstellung eines getaggten Vektors und Lokalisation	Nieren-zellkarzinom	Niere	8310/3	C64.9	<b>[a]</b> Expression in Gehirn, Herz, Lunge, Plazenta, Niere, Leber, Skelettmuskel, Pankreas <b>[b]</b> Herunterregulation von FAM107A fand sich „in acht von acht RCC Zelllinien, in einer von sieben ovariellen Zelllinien, in einer von einer zervikalen Zelllinie, in einer von einer gastralen Zelllinie und in einer von einer NSCLC-Zelllinie“, Herunterregulation in 23 von 34 primären Nierenzellkarzinomen <b>[c]</b> Wachstumsretardierung <b>[d]</b> keine Mutationen in den Gewebeprobe, aber in den Nierenkarzinomzelllinien <b>[e]</b> Lokalisation im Nukleus
(Zhao et al., 2007)	<b>[a]</b> Whole-mount-in-situ Hybridisierung von <i>Xenopus laevis</i> <b>[b]</b> RT-PCR <b>[c]</b> Proliferationsanalyse nach Transfektion von FAM107A Homologe xDRR1 des <i>Xenopus laevis</i> <b>[d]</b> Fusionsprotein mit EGFP, Transfektion und Fluoreszenzanalyse zur zellulären Lokalisation	Entfällt	Entfällt	Entfällt	Entfällt	<b>[a]</b> Expression in Ektoderm und Mesoderm. In späterer Embryogenese findet sich DRR1 im Hirn, Herz und Somiten. <b>[b]</b> Expression in Stadien 1,6,10,13, 17,22,28,35 Zellen, ebenso in Herz, Leber, Rückenmark, Testis, Lunge, Gehirn, Niere, Auge; Zunahme der Expression mit der Entwicklung, besonders starke Expression in Hirn und Herz. <b>[c]</b> Wachstumsretardierung nach Transfektion von FAM107A in A5494. <b>[d]</b> Lokalisation im Nukleus

Tab 8.5: Bioinformatische Analysen, zum Teil von schon vorhandenen Datensätzen

Autor	Art der Analyse	Zellen bzw. Gewebe	ICDO-3-Code (Topografie)	Ergebnis
(Chen et al., 2006)	Digitales Differenziales Display (DDD) von UniGene EST-Daten	Auge Gehirn Kolon Mamma Prostata Respirationstrakt	C18.9 C34.9 C50.9 C61.9 C69.4 C71.9	<b>[a]</b> Herunterregulation bei Mamma-, Prostata-, Retina-, Bronchial- und Gehirntumoren <b>[b]</b> Hochregulation bei ovariellen und Kolontumoren
(Chong et al., 2007)	<b>[a]</b> Meta-Analyse von cDNA-Microarraydaten (Gene Sorter, UCSC; Gene Expression Omnibus (GEO, NCBI); CLEO Datenbank, Stanford Microarray Database) <b>[b]</b> Bioinformatische Analyse von Promotorsequenzen	Gehirn	C71.9	<b>[a]</b> Koexpression von FAM107A zusammen mit GRIAs, Neurotransmitter Rezeptoren im Gehirn <b>[b]</b> Ähnliche Promotorprofile
(Langston et al., 2003)	Bioinformatische Analyse vorhandener cDNA-Microarray Daten, um anhand vorhandener Expressionsprofilanalysen Gene zu identifizieren, die in Normal- und Karzinomgewebe differenziell exprimiert werden und daher als Marker für die Karzinogenese dienen könnten			FAM107A als Diskriminator zwischen Normal- und Karzinomgewebe ohne Angabe der Regulation (Harvard Dataset)
(Lu et al., 2007)	<b>[a]</b> Auswertung von cDNA-Microarray-Experimenten (Datasets aus 39 Studien aus öffentlichen Datenbanken) <b>[b]</b> qRT-PCR (Mamma-, Bronchial-, Prostata-, Kolon- und Cervixkarzinomen (ohne nähere Angaben))	Cervix Kolon Mamma Prostata Respirationstrakt	C53.9 C50.4 C61.9 C69.4 C71.9	<b>[a]</b> in 9 von 14 untersuchten Tumoren herunterreguliert und in einem Tumor hochreguliert war (ohne Angabe der Tumoren) <b>[b]</b> Herunterreguliert in allen Tumorseiten versus Normalgewebe
(Wiemann et al., 2001)	Sequenzierung von EST-Sequenzen und Bioinformatische Analyse (cDNA-Libraries vom DKFZ)	Auge Gehirn	C18.9 C34.9	Expression in Gehirn und Retina

Tab 8.6: Übersicht über Viren, mit denen Zellen transformiert waren oder infiziert worden waren.

Familie	Subfamilie	Genus	Spezies/Virusname	Abkürzung	Taxonomy ID (Wheeler et al., 2000)
<b>Adenoviridae</b>		Mastadenovirus	Human Adenovirus 5	HAdV-5	28285
<b>Herpesviridae</b>	Betaherpesvirinae	Cytomegalovirus	Human herpesvirus 5 strain AD169	HHV-5-AD169, CMV-Laborstamm	10360
	Betaherpesvirinae	Cytomegalovirus	Human herpesvirus 5 strain Hi91 (Cinatl et al., 1999)	HHV-5-Hi91, CMV-Patientenstamm	Ohne Nummer, HHV-5 allgemein: 10359
<b>Papillomaviridae</b>		Alphapapillomavirus	Human papillomavirus -18	HPV-18	337042
<b>Paramyxoviridae</b>	Polyomaviridae	Polyomavirus	Simian virus 40	SV40	10633
<b>Retroviridae</b>	Orthoretrovirinae	Betaretrovirus	Mason-Pfizer monkey virus	MPMV	11855

**Tab 8.7: Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide.**

Die Tabelle gibt eine Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide, die Zugangsnummern („accession numbers“) der verwendeten Referenzsequenzen und die Position in den entsprechenden Sequenzen. Als Referenzsequenzen wurden die Sequenzen der Datenbank Genbank (Benson et al., 2007) zu Grunde gelegt beziehungsweise für die vektorspezifischen Primer die Sequenz des Vektors pCDNA3.1ZEO(+) (siehe 2.1.7).

Primer Name	Sequenz (5' → 3')	„accession number“	Position in der Referenzsequenz
FAM107A-1+	ctgcctcaggaagctggcttcc	NM_001076778	1-23
FAM107A-458+	gaattcgccatgtactcggagatccag (5' gaatt findet sich nicht in der Referenzsequenz)	NM_001076778	458-479
FAM107A-513+	cggccagaatacagagagtgg	NM_001076778	513-533
FAM107A-615+	ctcatgaaccacagaaggggc	NM_001076778	615-635
FAM107A-696+	ctcatcaagaagaagaaggagg	NM_001076778	696-717
FAM107A-850-	ttttccctgactttaataaactcg	NM_001076778	850-827
FAM107A-897-	gaattcctacagctctctctctcg (gaattc 5' vorgeschaltet, nicht in der Referenz)	NM_001076778	897-875
FAM107A-936+	ggacagcctcctcagccctc	NM_001076778	936-957
FAM107A-957-	gaagggctgaaggaggctgtcc	NM_001076778	957-936
FAM107A-1011-	aggtgggaacatcacagacgtcc	NM_001076778	1011-989
FAM107A-989+	ggacgtctgtgatgttccacct	NM_001076778	989-1011
FAM107A-936+	ggacagcctcctcagccctc	NM_001076778	936-957
FAM107A-1222-	aaggctgtcaagtcagagg	NM_001076778	1222-1203
FAM107A-1262-	agcctcggagattcctggtg	NM_001076778	1262-1243
FAM107A-2008-	gtaacagtgtgtcacactg	NM_001076778	2008-1989
FAM107A-2880-	cacctctggggaccactgg	NM_001076778	2880-2862
FAM107A-3364-	gacgtcaaacaagagggtattttatttacaag aattctgg (5'gacgtc nicht in Referenz)	NM_001076778	3364-3327
FLNB-2631+/-	ccttcagagtc aaagttgacc	NM_001457	2631-2652
FLNB-2822-	atccaaatccttcactgcatcg	NM_001457	2822-2801
pcDNA3.1-797+	ggaggcttatataagcagagc	PCDNA3.1ZEO(+)	797-817
pcDNA3.1-839+	cactgcttactggcttatcg	PCDNA3.1ZEO(+)	839-858
pcDNA3.1-1031-	acagtcgaggctgacgac	PCDNA3.1ZEO(+)	1031-1013
pcDNA3.1-1275-	gctggttctttcgcctcag	PCDNA3.1ZEO(+)	1275-1256
pcDNA3.1-213+	gtacggggccagatatacgcg	PCDNA3.1ZEO(+)	213-232
pcDNA3.1-170+	gaagaatctgcttagggtagg	PCDNA3.1ZEO(+)	170-191
pcDNA3.1-IRES-GFP-1119-	ttgccaaagacggcaatatg	PCDNA3.1ZEO(+)-IRES-EGFP	1119-1099
Chr3-58505732-	ttattgagcccctcagtactg	NT_022517.17	58505712-58505732
Chr3-58503509+	ggaagccaagcttctgagg	NT_022517.17	58503509-58503528
Chr3-58035418-	gctgaagtgtgtaggttcattgc	NT_022517	58035442-58035418
Chr3-58035874+	aacgcattgacatccagatgaagaacc	NT_022517	58035874-58035901

**Tab 8.8: Spezielle PCR-Protokolle.** Übersicht über die verwendeten PCR-Protokolle mit Angabe der Dauer der unterschiedlichen Phasen der jeweiligen PCR und Angabe der gewählten Temperaturen.

Primerpaare	Dauer der Denaturierung bei 95°C [min]	„Annealing“		Dauer der Elongation bei 72°C [min]	Anzahl der Zyklen	erwartete Amplikonlänge [bp]
		Temp. [°C]	Dauer [min]			
Chr3-58035418-/ Chr3-58035874+	0,5	65	0,5	1	40	484
Chr3-58505732-/ Chr3-58503509+	1	60	1	3	40	2224
FAM107A-1+/ FAM107A-1011-	1,5	65	1,5	1	40	1011
FAM107A-1+/ FAM107A-957-	1,5	65	1,5	1	40	957
FAM107A-1262-/ FAM107A-936+	0,5	62	0,5	0,5	40	327
FAM107A-458+/ FAM107A-1262-	0,5	60	0,5	1	35	810
FAM107A-458+/ FAM107A-897-	0,5	60	0,5	1	35	450 (cDNA) 3288 (genomisch)
FAM107A-459+/ FAM107A-628-	0,5	56	0,5	1	35	170 (cDNA+genomisch)
FAM107A-513+ / FAM107A-957-	0,5	64	0,5	1	35	445
FAM107A-696+/ FAM107A-850-	1	60	1	1	35	155 (cDNA) 667 (genomisch)
FAM107A-936+/ FAM107A-3364					2435	
FAM107A-989+/ FAM107A-3364-	1	65	1	3	40	2382
FLNB-2665+/FLNB-2856-	0,5	60	0,5	1	35	192 (cDNA) 459 (genomisch)
pcDNA3.1-1275-/ pcDNA3.1-213+	1	58	1	3	40	1063
pcDNA3.1-170+/ FAM107A-897-	0,5	63	0,5	1	40	1232 (FAM107A-ORF-Vektor) 1694 (FAM107A 1,1-Vektor)
pcDNA3.1-797+/ FAM107A-897-	0,5	58	1	1	40	605 (pcDNA3.1ZEO(+) FAM107A-ORF-IRES-EGFP)
pcDNA3.1-797+/ FAM107A-957-	1	58	1	5	40	1122 (pcDNA3.1ZEO(+) FAM107A-1,1-IRES-EGFP)
pcDNA3.1-797+/ pcDNA3.1-1031-	1	58	1	5	40	1544 (pcDNA3.1ZEO(+) IRES-EGFP)
pcDNA3.1-839+/ pcDNA3.1-1031-	0,5	58	1	1	35	193 (Leervektor) 637 (cDNA orf)

**Tab 8.9: Übersicht über die Behandlung der Zelllinien mit Decitabin.** Die unbehandelten Zellen sind mit „Ko“ (Kontrolle bezeichnet), die mit DMSO behandelten Zellen mit „DMSO“; die mit Decitabin behandelten mit „D“. Die jeweilig gewählte Konzentration steht in Spalte 3. Die mit \* markierten Zellzahlen sind Mittelwerte aus Triplikata-Ansätzen.

Zelllinien	Verdopp- lungszeit [h]	Decit abin [µM]	Zellzahl [x10 <sup>4</sup> ] 3 Tage Versuch 1	Zellzahl [x10 <sup>4</sup> ] 3 Tage Versuch 2	Zellzahl [x10 <sup>4</sup> ] 4 Tage Versuch 1	Zellzahl [x10 <sup>4</sup> ] 4 Tage Versuch 2	Zellzahl [x10 <sup>4</sup> ] 5 Tage Versuch 1	Zellzahl [x10 <sup>4</sup> ] 5 Tage Versuch 2	Zellzahl [x10 <sup>4</sup> ] 5 Tage Versuch 3
RCC-1 Ko	30		296,3*	137,83*	848	-	-	-	-
RCC-1 DMSO			304,7*	150,167*	804	-	-	-	-
RCC-1 D		2	74,7*	42,3*	77	-	-	-	-
HTB-46 Ko	42		215	-	-	-	352	-	-
HTB-46 DMSO			241	-	-	-	402	-	-
HTB-46 D		1	71,5	-	-	-	21	-	-
HTB-46 D		2	57	-	-	-	17,5	-	-
HTB-46 D		5	56,5	-	-	-	21	-	-
SN12c Ko	34		-	-	-	-	594	320	-
SN12c DMSO			-	-	-	-	610	272	-
SN12c D		2	-	-	-	-	102,5	45,6	-
H23 Ko	38		-	-	-	-	31,95	12,6	-
H23 DMSO			-	-	-	-	37,65	19	-
H23 D		1	-	-	-	-	9,15	4	-
H23 D		2	-	-	-	-	7,2	-	-
HBL-100 Ko	Nicht gemessen		-	-	-	-	181	123	378,7*
HBL-100 DMSO			-	-	-	-	219,5	156	350*
HBL-100 D		2	-	-	-	-	44,5	26,5	36,2*
MCF7 Ko	29		-	-	434	-	318	-	-
MCF7 DMSO			-	-	370	-	294	-	-
MCF7 D		1	-	-	89	-	59	-	-
MCF7 D		2	-	-	-	-	40	-	-
MCF7 D		5	-	-	-	-	56	-	-
BLM Ko	47		-	-	144	216,5	-	-	-
BLM DMSO			-	-	116	215	-	-	-
BLM D		1	-	-	41	63	-	-	-
BLM D		2	-	-	36	53,5	-	-	-
BLM D		5	-	-	25,5	49	-	-	-

**Tab 8.10: Karyotypen der Zelllinien.** Die Nomenklatur geht von dem diploiden Karyotyp aus. Die Beschriftung erfolgte nach Mitelman, 1995.

Zelllinie	Zusammengesetzte (composite, cp) Karyotypen
ACHN p48	52~53,X-Y,+der(1)(p),+2,+7,+7,+12,+12,+16,+17,+1mar [cp11]
ARPEp38	40~46,XY,add(10)(p),-18 [cp11]
BLM p41	58~62,+del(x)(q),-X,-Y,del(1)(p), iso(1)(p),add(1)(q), +2,add(3)(q),del(3)(p),+der(3)(p),add(5)(p), add(7)(p),del(7)(q),+der(7)(p/q),+9,+der(9)(p),+der(9)(q),+10,+der(10)(q),+11,+der(11)(q),-14,-14,-15,+16,+16+17,+18,+19,+19,+20,+21,-22,+6mar [cp6]
DH1 p14	45~46,XY [cp3]
H23 p12	47~49,XX,-Y,-1,dup(1)(q),-2,der(3)(p), der(3)(q), +der(3)(p),+der(3)(q),+del(3)(q),add(5)(p), add(5)(p), +del(5)(q), +6q, add(7)(p),-8, del(9)(q), add(11)(p),+12,-13, add(13)(p),-14,-14,-15,+add(16)(p),-19,add(19)q,add(20),add(20)(q), +add(20)(q),-21,-22,-22,9mar [cp6]



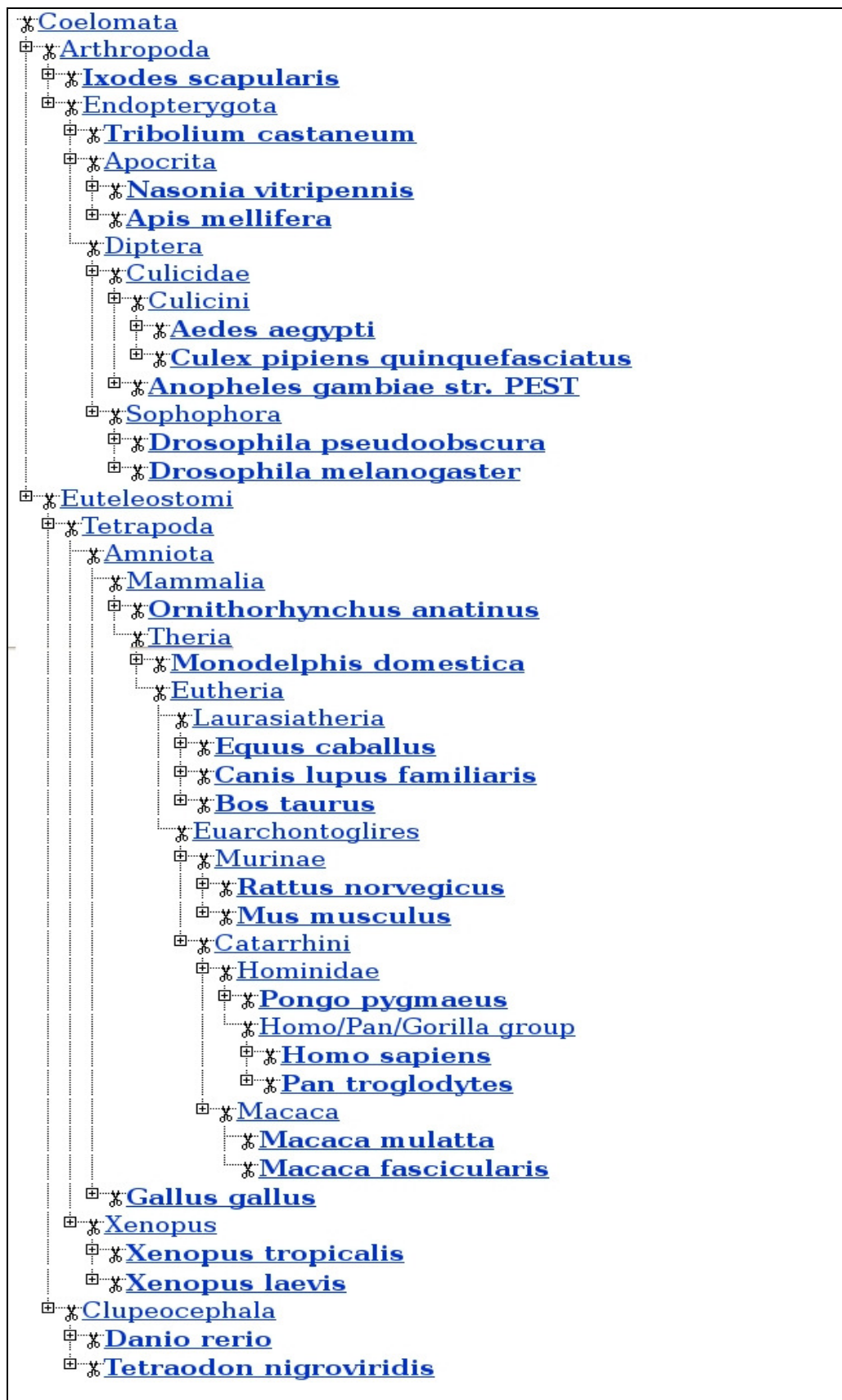
Zelllinie	Zusammengesetzte (composite, cp) Karyotypen
H460 p8	58~60,XXY,XXYY,+del(1)(p),+2,+3,+5,-7, add(9)(p), add(9)(p), der(9)(q), del(9)(q),+del(9)(q), +del(12)(p),+15, add(16)(q), +add(16)(q),+17,+19,+20,+22,+4mar [cp10]
HBL100 p12	63~67,X-X,+1,-2,+del(3)(p),+del(3)(q),der(3)(p/q),+der(3)(p/q),4,+5,+6,+del(6)(q), +der(6)(q),+7, +der(7)(p), +der(7)(p/q),-8, +9,+9, add(11)(p),+add(11)(p), add(11)(q), +add(11)(q), del(11)(p), add(12)(p),+add(12)(p), +add(13)(p), +add(13)(q),-14, add(14)(p),-15,add(15)(q),-16, add(16)(p), iso(17)(q),-18,add(19)(q),+add(19)(q),+20,+20, -21,+22,+22,+10mar [cp8]
Hela p21	59~82,XX,-X,+1,+1,+del(1)(p),+chtb(1)(p), +der(1)(p), +2, ,der(3)(p),der(3)(q), +der(3)(p), +der(3)(q),+del(3)(p),+del(3)(q),+4,+5,+del(5)(p), +der(5)(p),+6,del(6)(q),+7, +8,+9, del(9)(q), +del(9)(q), +del(9)(q),+10,+10,+11,+del(11)(q),+12, +13,+13,+14,+15,+15 +16,+17, +17,+18,+18,+19,+20,+20,+21,-22, +6mar [cp12]
HTB-45 p7	85~86,XXY,XXYY,+1,+2,+2,+3,+4,+5,+7,+7,+7, +8,+9, +10,+11, +11,+12,+12,+13,+15, +15,+16, +17,+18,+19,+19,+21,+21,+22, [cp2]
HTB-46 p34	52~66,X-Y,+del(1)(p),+der(1)(p),+2,+4,+6,del(6)(q),+del(6)(q),+7,+8,add(9)(q),add(9)(q), +add(9)(q),+10,+10,+11,+add(11)(p),+12,+del(12)(p),-14,-15,+16,+16,-18,add(19)(q), +add(19)(q), add(21)(q),+8mar [cp7]
MCF7 p75	66~71,X-X,der(1)(q),+2,+add(2)(q),+3,+der(3)(q),+del(3)(q),+4,+4,+5,+der(6)(q),+7, del(7)(q),+8, +9,+9,add(10)(p), +add(10)(p), +add(10)(p), +add(10)(q), +11,+der(11)(q),add(12)(p),-12,+14,-15,+16, +16,+17,+18,-20,-20,+21,+21,+22,+22,+10mar [cp8]
MG1 p12	46~49,X-X,add(1)(p), del(2)(p), del(3)(p),+der(3)(p),+der(3)(p/q),+16,+20,-22,-22,+3mar [cp11]
MV3 p35	94~114,-X,XXX,+del(1)(p), +del(1)(p),+2,+add(3)(q), +add(3)(q),+del(3)(q),+5,+6,+6,+6,+add(7)(p),+del(8)(q),+9,+10,+10,+add(10)(p),+11,+11,+11,+12,+17,+17, +18,+19,+20,+20,+20,+20,+21,+5mar [cp2]
MzMel p36	43~51,X-Y,add(3)(q),-4,-5,+2mar [cp5]
RCC-1 p75	68~75,XY,XXY,+1,+del(1)(p),+2,+3,+del(3)(p),+5,+6,+7,+7,+der(7)(p),+9,+9,+9, +del(9)(p), +del(9)(p),-10,-10,+11,+del(11)(p8),+12,+13,+13,+14,+14,+15,+15,+16,+17, +18,+19, +20,+20, +21,del(22)(q),+4mar [cp7]
SN12c p20	62~65,XX,+2,+del(2)(p),+3,+del(3)(p),+del(3)(q),4,+5,+6,add(7)(p),+add(7)(p),+8,del(9)(q), +del(9)(q),+del(9)(q),+10,+11,+add(12)(p),del(12)(p),+14,-15,+16,+17,+18,+20,+22,+22, +add(22)(q),+add(22)(q), +3mar [cp6]

**Tab 8.11: Karyotypen der stabil transfizierten RCC-1- und HTB-46-Zellen.**

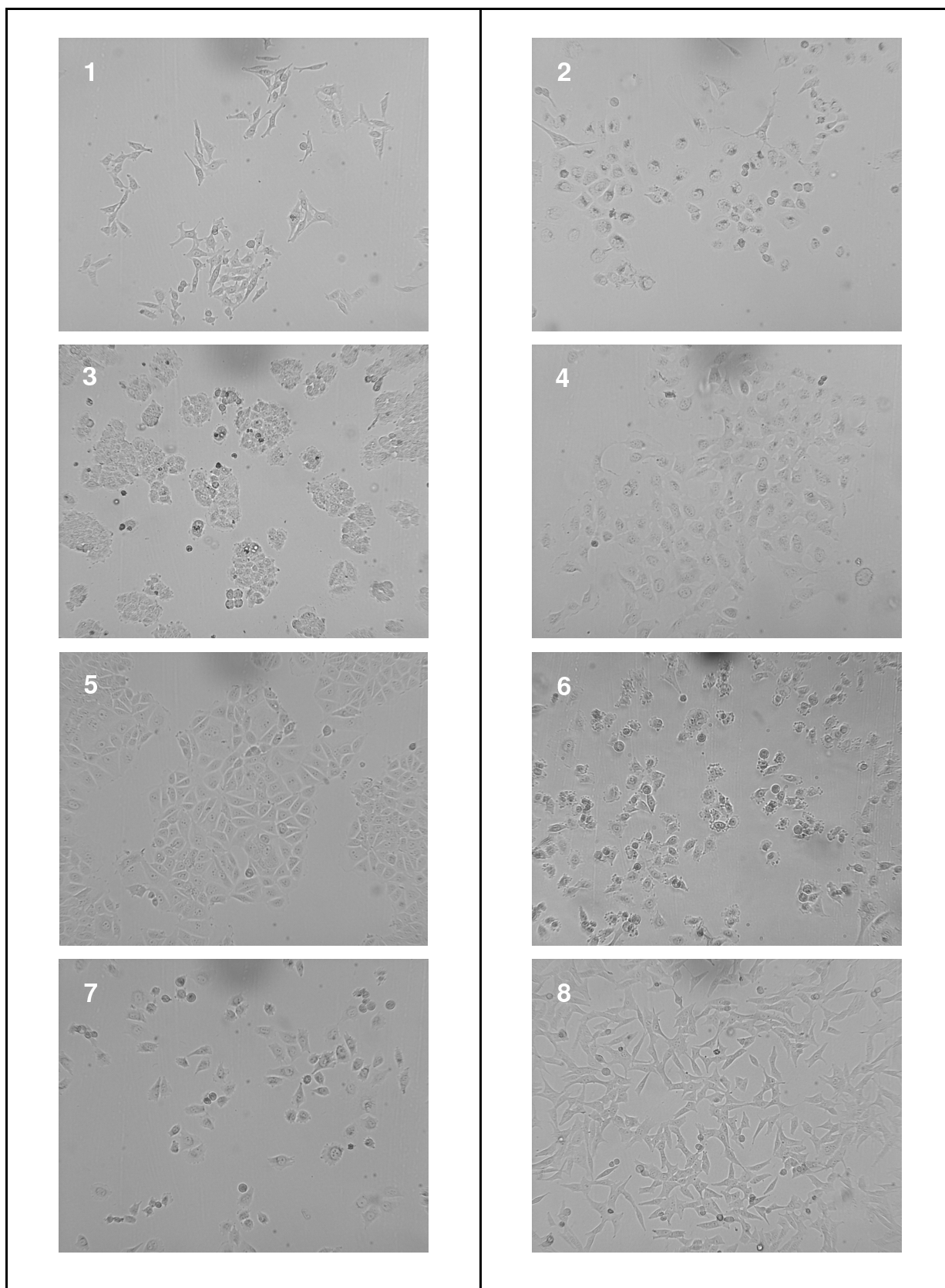
Die Nomenklatur geht von dem diploiden Karyotyp aus. Die Beschriftung erfolgte nach Mitelmann, 1995. Einige klonale Marker sind markiert.

Karyotyp RCC-1	Karyotyp RCC-V	Karyotyp R03
68~75,XY,XXY,+1,+del(1)(p),+2,+3,+del(3)(p),+5,+6,+7,+7,+der(7)(p), +9,+9,+9, +del(9)(p), +del(9)(p),-10,-10,+11,+del(11)(p8),+12,+13,+13, +14,+14,+15,+15,+16,+17, +18,+19, +20,+20, +21,del(22)(q),+4mar [cp7]	68~74,XXYY,+1,+der(1)(p), +der(1)(p),+3,+5,+5,+6,+7,+7,+a dd(8)(p),+9,+9,+9,+der(9),+der(9)(p), +der(9)(p),-10,-10,+der(10)(q),+11, +11der(p),+12,+13,+13,+14,+15, +15,+16,+16,+16,+17,+18,+18,+19, +20,+20,+20,-22,-22,+6mar [cp10]	68~71,XXY,+1,+der(1)(p), +2,add(2)(p),+add(2)(p),+4,+5,+5, +6,+6,+7,+7,+8,+8,+add(8)(p),+9,+9, -10,-10,+11,+12,+13,+14,+14, +15,+16,+17, +18, +18, +19,+20, +20,-22, +5mar [cp10]
Karyotyp HTB-46	Karyotyp HTB-V	Karyotyp H08
52~66,X-Y,+del(1)(p),+der(1)(p), +2, +4,+6,del(6)(q),+del(6)(q),+7,+8, add(9)(q),add(9)(q),+add(9)(q),+10, +10,+11,+add(11)(p),+12, +del(12)(p),-14,-15,+16,+16,18, add(19)(q),+add(19)(q),add(21)(q),+ 8mar [cp7]	58~114,XY,XXY,+1,+del(1)(p),-2, +3, +del(3)(p), +del(3)(p), +del(3)(q),+4, +4,+5,+5,+5,+6,+6,+del(6)(q),+del(6)(q),+7,+7,+add(7)(p),+8,+8,+add(8)(p),+del(8)(q),+del(8)(q11),+del(8)(q 11), +9, +9, +del(9)(p11),-10,-10,+11,+add(11)(q), +12,+13, +13, +14, +15, +15, +16, +16, +16, +17, +17, +18, +19, +20, +20, -21, -21, -22, -22, +6mar [cp12]	60~70,XX,-Y,+1, +del(1)(p), +der(1)(p), +del(1)(q), +2, +del(3)(p), +del(3)(q),+4,+5,+6,+del(6)(q),+7,+8 ,del(8)(q),+ del(8)(q), +add(9)(p), add(9)(q),+add(9)(q),+add(9)(q),+de l(9)(q),+10,+10,+12,+12, -14, -14,-15,+16,+add(16)(q), +17, iso(17)(q), +iso(17)(q), +18,+18, add(19)(q), +20,-20, -22, +4mar [cp10]

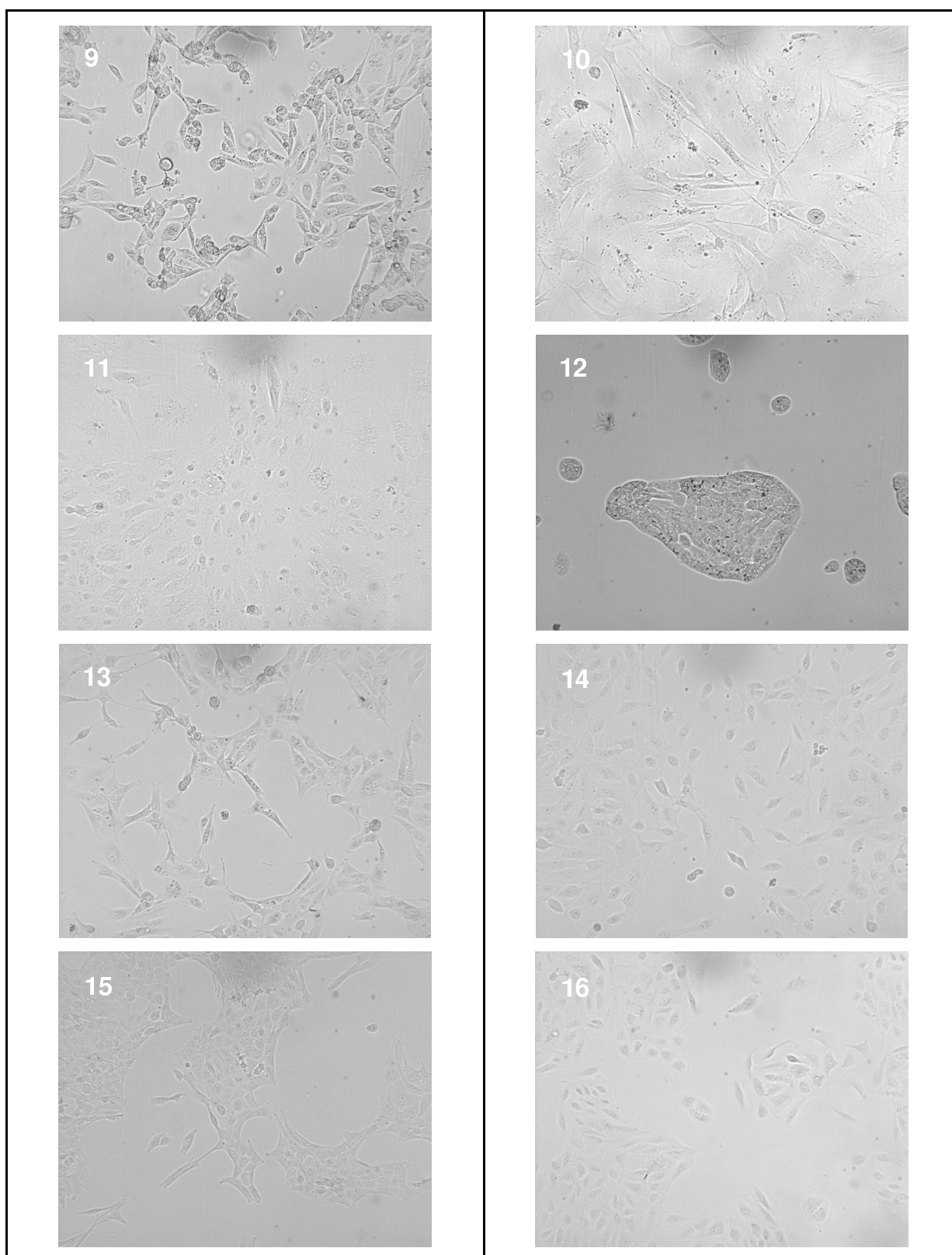
## Anhang D, Abbildungen 55-57



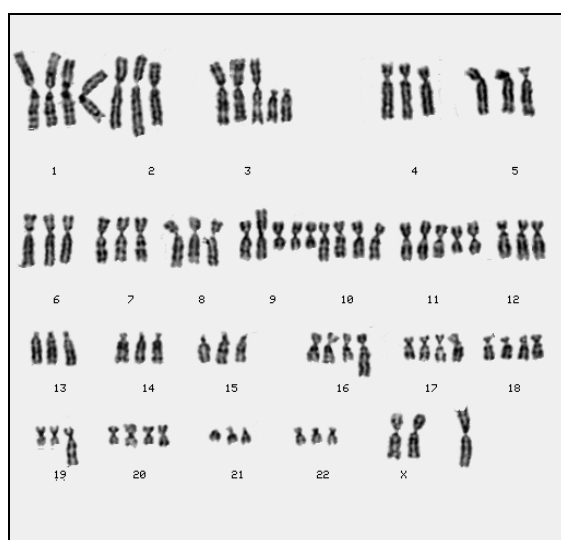
**Abb 55: Stammbaum der Spezies, die die Domäne DUF1151 enthalten.** Aus CDART: Conserved Domain Architecture Retrieval Tool (Marchler-Bauer et al., 2007).



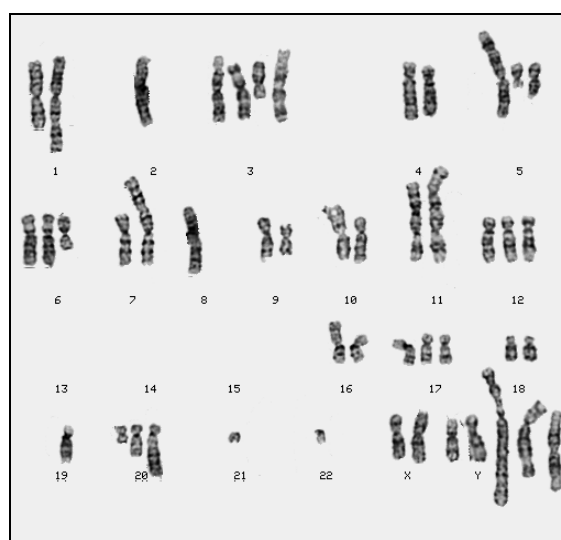
**Abb 56, 1-7: Morphologie der verwendeten Zelllinien.** Ausschnitte von beispielhaften Aufnahmen der Zellkulturen: 1: HeLa, p21; 2: H23 p8, Zelllinie als zweifelhaft eingestuft (Wang et al., 2006); 3: H460, p14; 4: HBL-100, p44; 5: MCF7, p93; 6: BLM, p33; 7: MV3, p38; 8: MZ2-MEL, p43 (Objektiv-Vergrößerung 40X).



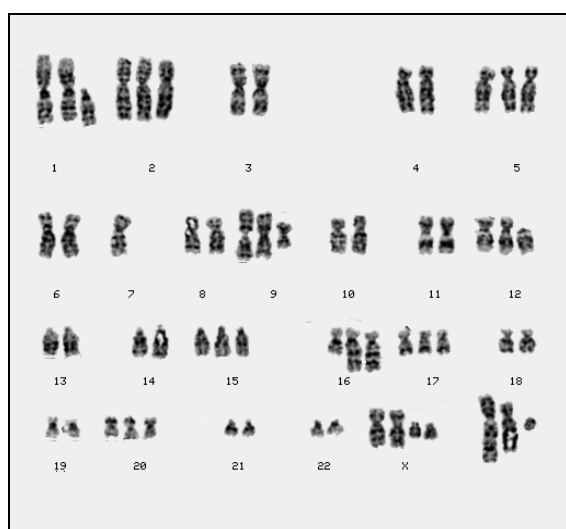
**Abb 56, 9-16: Morphologie der verwendeten Zelllinien.** Ausschnitte von beispielhaften Aufnahmen der Zellkulturen: 9: ACHN, p52; 10: DH1, p12; 11: MG1, p10; 12: HTB-45, p9; 13: HTB-46, p25; 14: RCC-1, p81; 15: SN12c p14, Zelllinie als zweifelhaft eingestuft (Wang et al., 2006); 16: ARPE-19, p37 (Objektiv-Vergrößerung 40X).



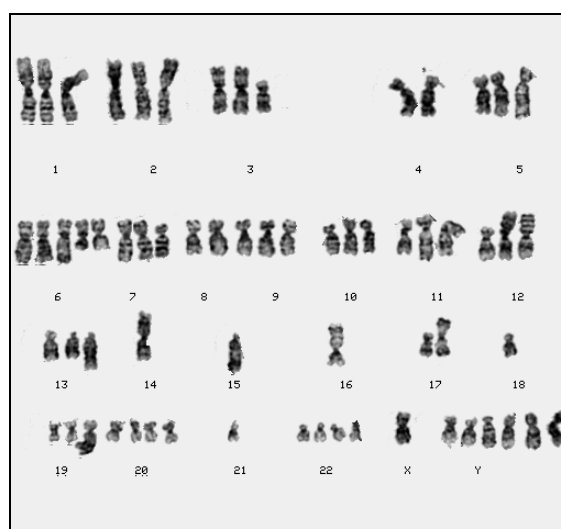
1



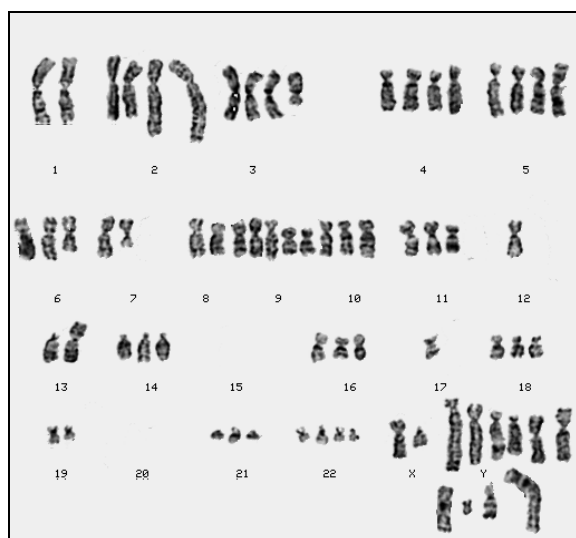
2



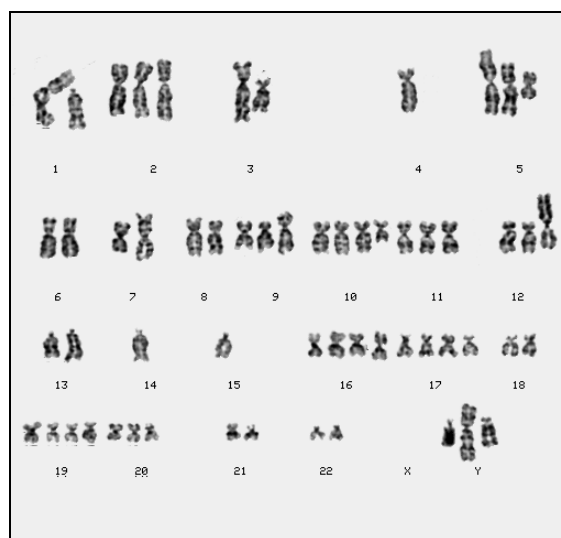
3



4

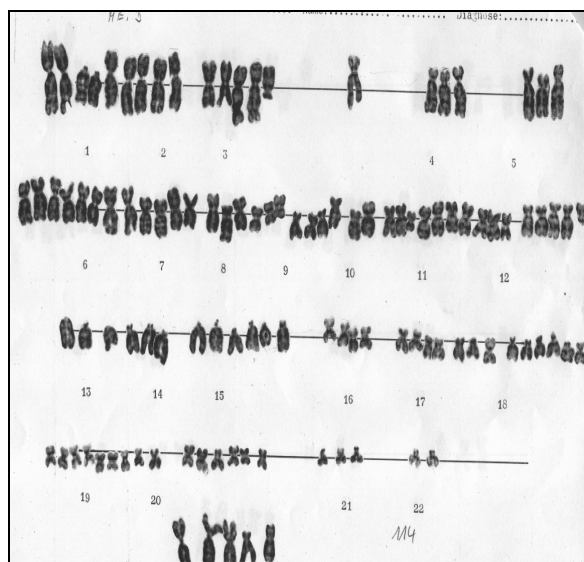


5

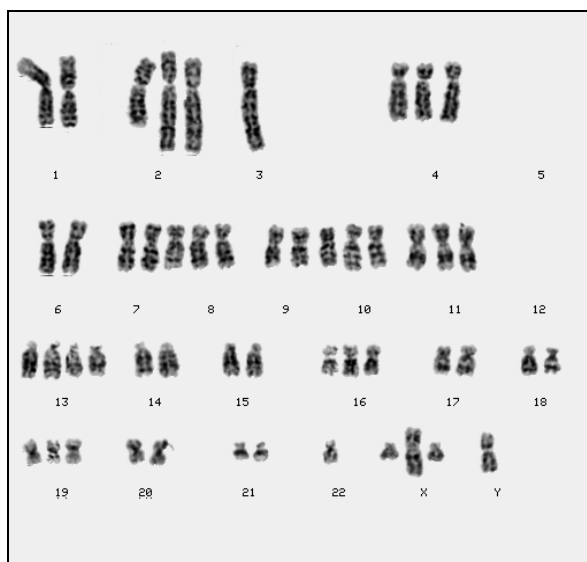


6

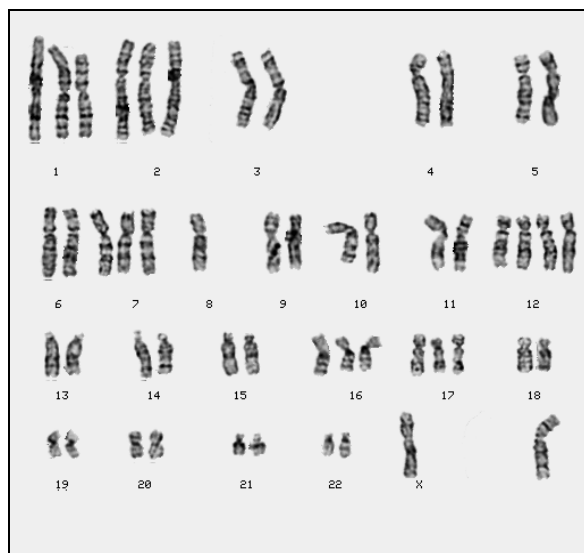
**Abb 57, 1-6: Karyogramme der verwendeten Zelllinien:** 1: HeLa, p21; 2: H23, p12; 3: H460, p8; 4: HBL-10,0 p12; 5: MCF7, p75; 6: BLM, p41. Korrumpierte Chromosomen („Marker“) sind mitunter bei „Y“ abgelegt.



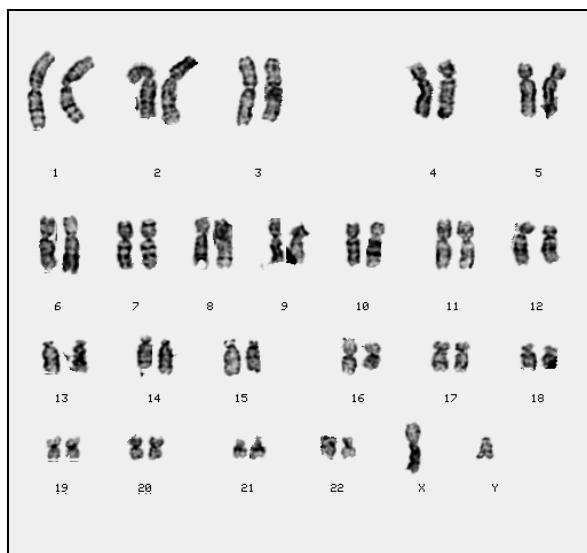
7



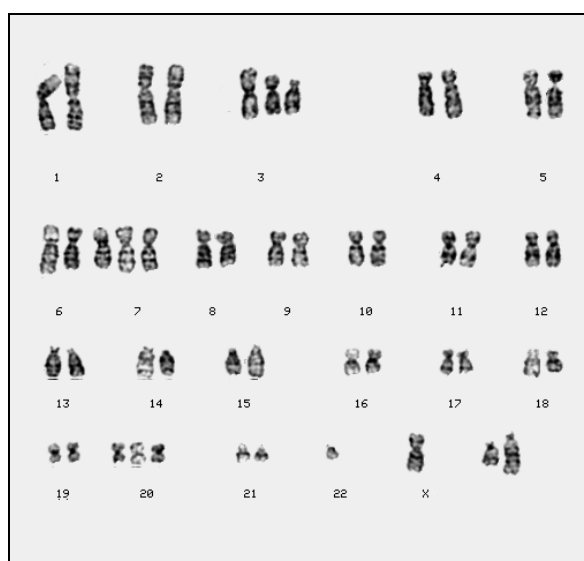
8



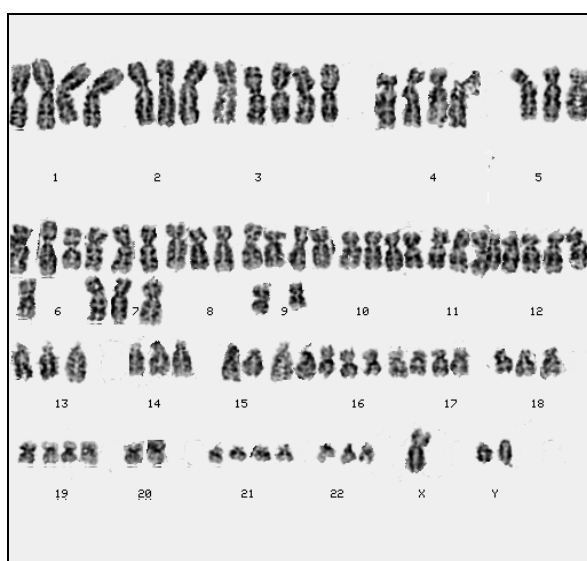
9



10

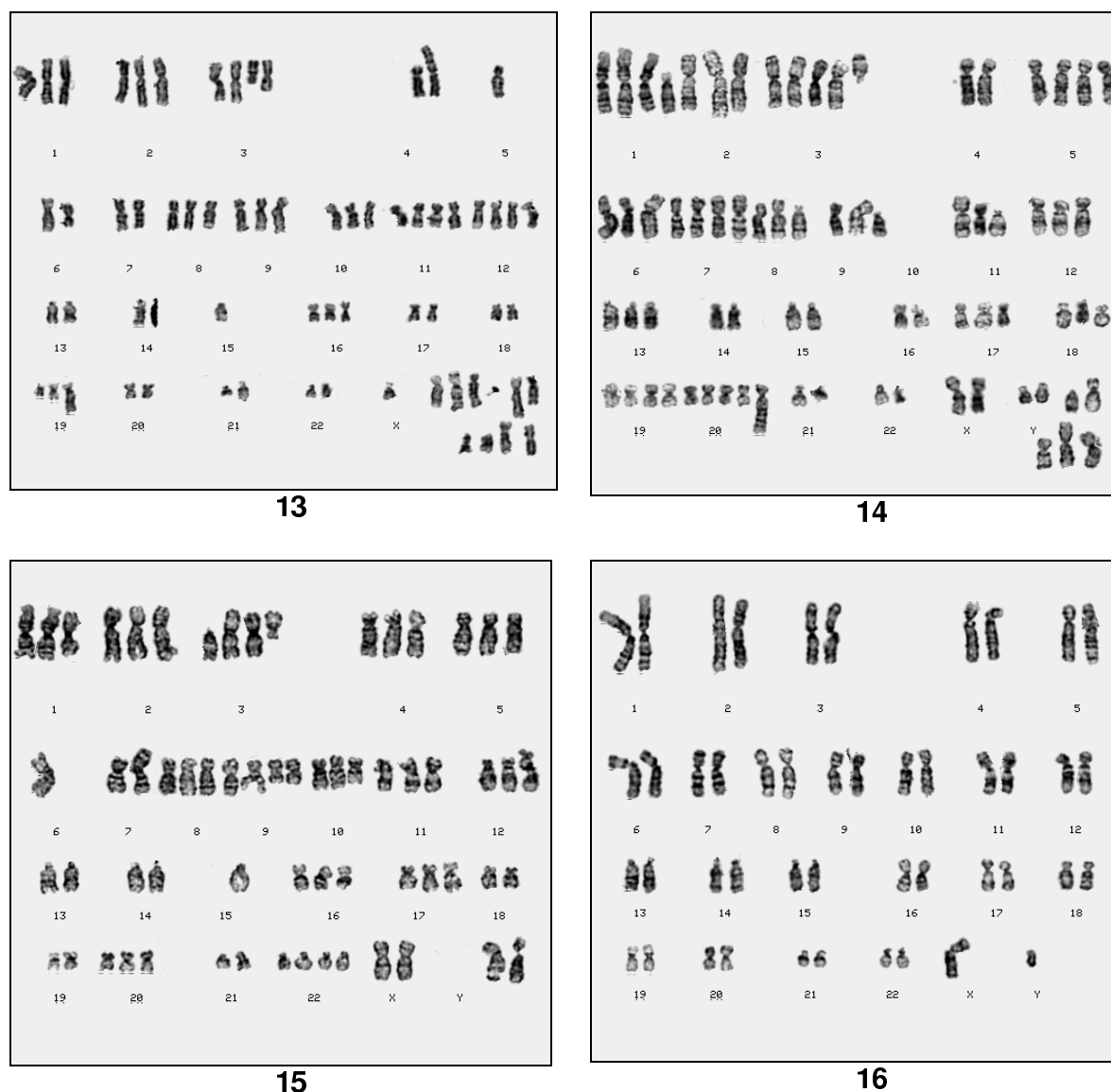


11



12

**Abb 57, 7-12: Karyogramme der verwendeten Zelllinien:** 7: MV3, p35; 8: MZ2-MEL, p36; 9: ACHN, p48; 10: DH1, p14; 11: MG,1 p12; 12: HTB-45, p7. Korruptierte Chromosomen („Marker“) sind mitunter bei „Y“ abgelegt.



**Abb 57, 13-16: Karyogramme der verwendeten Zelllinien** Pro Zelllinie wurden je nach Verfügbarkeit von Metaphasen 2 bis 12 Präparate untersucht. Die einzelnen Metaphasen einer Zelllinie zeigten Abweichungen sowohl bezüglich Gesamtchromosomenanzahl als auch bezüglich der Aberrationen. 13: HTB-46, p34; 14: RCC-1, p75; 15: SN12c, p20; 16: ARPE-19, p38. Korruptierte Chromosomen („Marker“) sind mitunter bei „Y“ abgelegt. (Exemplarische Abbildungen).



## Anhang E: Sequenzen

27487	70	CTGCCTCAGGAAGCTTGGCTTCCCTCCCATGGGGAAGTGCTGGAATCCACTCTTGCCTG	129
<a href="#">NM_001076778</a>	1	.....	60
<a href="#">NM_007177</a>	1	.....	60
27487	130	ACCCTCCCATAGAAACAAGGAAATTCCTTTACGTGAGCCGCTTGCTCAGAACAAAGC	189
<a href="#">NM_001076778</a>	61	.....	120
<a href="#">NM_007177</a>	61	.....	120
27487	190	TTGGCGTGTTCCTTATTCTCATCAATCTGACAAAATGGGTATTTATTTGTGCCTCTCAA	249
<a href="#">NM_001076778</a>	121	.....	180
<a href="#">NM_007177</a>	121	.....	180
27487	250	GCGTGTGGCTTGGACATGATGTTCCGCATCGTGGGAAGTGGCCGTGCACCAAGTGAATAT	309
<a href="#">NM_001076778</a>	181	.....	240
<a href="#">NM_007177</a>	181	.....	240
27487	310	CTGTTACTATAGTAACAGTTCCTTTTTATTGATACCAGAATAAACAGGAATGCAAAGGCT	369
<a href="#">NM_001076778</a>	241	.....	300
<a href="#">NM_007177</a>	241	.....	300
27487	370	GTCTCACTTGTGGCACATTTAGCAGCCTCCGTTCCCAAGGTTTAAGAACCGCCCTCT	429
<a href="#">NM_001076778</a>	301	.....G.....	360
<a href="#">NM_007177</a>	301	.....G.....	360
27487	430	AGAGGCAGCCCTCCTTGCTAGTCTGGGACTTCCCGTGGAGTGAGGAACCCAGCAACACG	489
<a href="#">NM_001076778</a>	361	.....	420
<a href="#">NM_007177</a>	361	.....	420
27487	490	CTCCTGACTTCCCTTCCCAAGGACTCGACCTGAGAACC GCCATGTACTCGGAGATCCAGA	549
<a href="#">NM_001076778</a>	421	.....	480
<a href="#">NM_007177</a>	421	.....	456
<a href="#">NM_007177</a>	555	.....	578
27487	550	GGGAGCGGGCAGACATTGGGGGCTGATGGCCCGGCCAGAATACAGAGAGTGGAATCCGG	609
<a href="#">NM_001076778</a>	481	.....	540
<a href="#">NM_007177</a>	579	.....	638
27487	610	AGCTCATCAAGCCCAAGAAGCTGCTGAACCCCGTGAAGNCTCTCGGAGTCACCAGGAGC	669
<a href="#">NM_001076778</a>	541	.....C.....	600
<a href="#">NM_007177</a>	639	.....C.....	698
27487	670	TCCACCGGAGCTGCTCATGAACCACAGAAGGGGNCNTNGNGTGGACAGCAAGCCAGAN	729
<a href="#">NM_001076778</a>	601	.....-C.T.T.....G	659
<a href="#">NM_007177</a>	699	.....-C.T.T.....G	757
27487	730	CTGCAGCGTGTCTANAGCACGNCCGGGGGAACCAAGCTCNTCAAAAAAAAAAANGANGAN	789
<a href="#">NM_001076778</a>	660	.....G.....CG....C.....A....G..G..G..G..G	719
<a href="#">NM_007177</a>	758	.....G.....CG....C.....A....G..G..G..G..G	817
27487	790	CTGGAAACCAAACGGNTGCANNGCCCTTTGA	821
<a href="#">NM_001076778</a>	720	.....G....G...C....GT.....	751
<a href="#">NM_007177</a>	818	.....G....G...C....GT.....	849

**Abb 58: Sequenzabgleich des Inserts des FAM107A-1,1-Vektors (1).** Durchgeführt mittels dem Computerprogramm „blastn“ („nucleotide blast“ mit der Datenbank „Reference mRNA sequences“ (Wheeler et al., 2000), überprüft am 29.11.2007) nach Sequenzierung mit dem T7 Promotor-Primer. Die Abbildung zeigt die Homologien mit den beiden Referenzsequenzen NM\_007177 und NM\_001076778. Ein Nukleotidaustausch, der von G nach A (Basenpaarposition 341, markiert durch einen roten Ring) erfolgte, lag außerhalb der kodierenden Sequenz. Weitere Abweichungen beruhten auf einer schlechten Qualität der Sequenzdaten und wurden in den Chromatogrammen (ab1-Daten) nicht bestätigt. Die Sequenzierung in der Gegenrichtung sicherte dies ab.



9462	99	AGGTGGGAACATCACAGACGTCCCAGGGCCTGGGGCCCAGGGCTGCCAGGTACAGAAGGG	158
<a href="#">NM_007177</a>	1109	.....	1050
<a href="#">NM_001076778</a>	1011	.....	952
9462	159	CTGAAGGAGGCTGTCCAGGCCAGGGTGGGCAGTGGCCTGAGCCCGGCAGCTGGCCCTACA	218
<a href="#">NM_007177</a>	1049	.....	990
<a href="#">NM_001076778</a>	951	.....	892
9462	219	GCTCTCTCTCTTCGCTGGTCAGTGTGGCAATTCTCCGCAGGTTTTCCCTGACTTTAATAA	278
<a href="#">NM_007177</a>	989	.....	930
<a href="#">NM_001076778</a>	891	.....	832
9462	279	ACTCGGGGGCGTGATCCTCTTCCTTCTCTGGTGGTTTTCCAGCTGGTTAAGCCTCTGCT	338
<a href="#">NM_007177</a>	929	.....C.....	870
<a href="#">NM_001076778</a>	831	.....C.....	772
9462	339	GCCGTCTCAGCAGCTCCTGCTCAAAGGGGCACTTGACCCGCTTGGCTTCCAGCTCCTCC	398
<a href="#">NM_007177</a>	869	.....-	811
<a href="#">NM_001076778</a>	771	.....-	713
9462	399	ATCTTCTTCTTGATGAGCTGGTTCGCCGGCGGTGCTCTAGGACACCCTTGACAGCTCTGG	458
<a href="#">NM_007177</a>	810	T.....G..-	752
<a href="#">NM_001076778</a>	712	T.....G..-	654
9462	459	CTTGCTGTC-ACACCAAGGCCCTTCTGTGGTT-ATGAGCAGCTCCCGGTGGAGCTCCTG	516
<a href="#">NM_007177</a>	751	.....C.....C.....	692
<a href="#">NM_001076778</a>	653	.....C.....C.....	594
9462	517	GGGACTCCGANAGGCCTT-ACNGGGGTTAA-CAGCTTNTTGG-CTTGATGAGCTCCGAAT	573
<a href="#">NM_007177</a>	691	.T.....G.....C..-.....C.G.....C....G.....G..	633
<a href="#">NM_001076778</a>	593	.T.....G.....C..-.....C.G.....C....G.....G..	535
9462	574	TCN-CTNITTGTATTNTGGC-GGGC-ATAAGNCCC--AATGT-TGCC	614
<a href="#">NM_007177</a>	632	..CA..C..C.....C....C....C..C..G...CC.....C....	586
<a href="#">NM_001076778</a>	534	..CA..C..C.....C....C....C..C..G...CC.....C....	488

**Abb 59: Sequenzabgleich Inserts des FAM107A-1,1-Vektors (2).** Durchgeführt mittels dem Computerprogram „blastn“ („nucleotide blast“ mit der Datenbank „Reference mRNA sequences“ (Wheeler et al., 2000), überprüft am 29.11.2007) nach Sequenzierung mit dem M13 Reverse-Primer. Die Abbildung zeigte die Homologien mit den beiden Referenzsequenzen NM\_007177 und NM\_001076778, des Weiteren die Abweichungen, die aber durch die Sequenzdaten mit dem T7 Promotor Primer widerlegt werden.

28178	59	CGCCATGTACTCGGAGATCCAGAGGGAGCGGGCAGACATTGGGGGCCTGATGGCCCGGCC	118
<a href="#">NM_007177</a>	556	.....	615
<a href="#">NM_001076778</a>	458	.....	517
28178	119	AGAATACAGAGAGTGGAATCCGGAGCTCATCAAGCCCAAGAAGCTGCTGAACCCCGTGAA	178
<a href="#">NM_007177</a>	616	.....	675
<a href="#">NM_001076778</a>	518	.....	577
28178	179	GGCCTCTCGGAGTCACCAGGAGCTCCACGGGAGCTGCTCATGAACCACAGAAGGGGCCT	238
<a href="#">NM_007177</a>	676	.....	735
<a href="#">NM_001076778</a>	578	.....	637
28178	239	TGGTGTGGACAGCAAGCCAGAGCTGCAGCGTGTCTTAGAGCACCGCCGGCGGAACCAGCT	298
<a href="#">NM_007177</a>	736	.....	795
<a href="#">NM_001076778</a>	638	.....	697
28178	299	CATCAAGAAGAAGAAGGAGGAGCTGGAAGCCAAGCGGCTGCAGTGCCCCCTTTGAGCAGGA	358
<a href="#">NM_007177</a>	796	.....	855
<a href="#">NM_001076778</a>	698	.....	757
28178	359	GCTGCTGAGACGGCAGCAGAGGCTGAACCAGCTGGAAAAACCACCAGAGAAGGAAGAGGA	418
<a href="#">NM_007177</a>	856	.....	915
<a href="#">NM_001076778</a>	758	.....	817
28178	419	TCACGCCCCCGAGTTTATTAAAGTCAGGGAAAACCTGCGGAGAATTGCCACACTGACCAG	478
<a href="#">NM_007177</a>	916	.....	975
<a href="#">NM_001076778</a>	818	.....	877
28178	479	CGAAGAGAGAGAGCTGTAGG	498
<a href="#">NM_007177</a>	976	.....	995
<a href="#">NM_001076778</a>	878	.....	897

**Abb 60: Sequenzabgleich des Inserts des FAM107A-ORF-Vektors** mittels „blastn“ („nucleotide blast“ mit der Datenbank „Reference mRNA sequences“ (Wheeler et al., 2000), überprüft am 26.12.2007) nach Sequenzierung mit dem mit dem Sequenz-Primer T7. Die Abbildung zeigte eine 100%ige Übereinstimmung mit dem ORF-Bereich (NM\_007177 und NM\_001076778).

8294	1	CTGCCTCAGGAAGCTTGGCTTCCCCTCCCATGGGGAAGTGCTGGAATCCACTCTTGCCTG	60
<a href="#">NM_001076778</a>	1	.....	60
<a href="#">NM_007177</a>	1	.....	60
8294	61	ACCCTCCCATAGAAACAAGGGAAATTCCTTTACGTGAGCCGCCTTGCTCAGAACAAAGC	120
<a href="#">NM_001076778</a>	61	.....	120
<a href="#">NM_007177</a>	61	.....	120
8294	121	TTGGCGTGTTCCTTATTCCTCATCAATCTGACAAAATGGGTATTATTTGTGCCTCTCAA	180
<a href="#">NM_001076778</a>	121	.....	180
<a href="#">NM_007177</a>	121	.....	180
8294	181	GCGTGTGGCTTGGACATGATGTTCCGCATCGTGGAAAGTGGCCGTGCACCAAGTGAATAT	240
<a href="#">NM_001076778</a>	181	.....	240
<a href="#">NM_007177</a>	181	.....	240
8294	241	CTGTACTATAGTAACAGTTCCTTTTATTGATACCAGAATAAACAGGAATGCAAAGGCT	300
<a href="#">NM_001076778</a>	241	.....	300
<a href="#">NM_007177</a>	241	.....	300
8294	301	GTCTCACTTGTGTGGCACATTTCCAGCAGCCTCCGTTCCCAAGGTTTAAGAACCGCCCTCT	360
<a href="#">NM_001076778</a>	301	.....G.....	360
<a href="#">NM_007177</a>	301	.....G.....	360
8294	361	AGAGGCAGCCCTCCTTGCTAGTCTGGGACTTCCCGGTGGAGTGAGGAACCCAGCAACACG	420
<a href="#">NM_001076778</a>	361	.....	420
<a href="#">NM_007177</a>	361	.....	420
8294	421	CTCCTGACTTCCCTTCCCAAGGACTCGACCTGAGAACCGCCATGTACTCGGAGATCCAGA	480
<a href="#">NM_001076778</a>	421	.....	480
<a href="#">NM_007177</a>	555	.....	578
<a href="#">NM_007177</a>	421	.....	456
8294	481	GGGAGCGGGCAGACATTGGGGGCTGATGGCCCGGCCAGAATACAGAGAGTGAATCCGG	540
<a href="#">NM_001076778</a>	481	.....	540
<a href="#">NM_007177</a>	579	.....	638
8294	541	AGCTCATCAAGCCCAAGAAGCTGCTGAACCCCGTGAAGGCCTCTCGGAGTCACCAGGAGC	600
<a href="#">NM_001076778</a>	541	.....	600
<a href="#">NM_007177</a>	639	.....	698
8294	601	TCCACCGGGAGCTGCTCATGAACCACAGAAGGGGCTTGGTGTGGACAGCAAGCCAGAGC	660
<a href="#">NM_001076778</a>	601	.....	660
<a href="#">NM_007177</a>	699	.....	758
8294	661	TGCAGCGTGTCTAGAGCACCGCCGGCGGAACCAGCTCATCAAGAAGAAGAAGGAGGAGC	720
<a href="#">NM_001076778</a>	661	.....	720
<a href="#">NM_007177</a>	759	.....	818
8294	721	TGGAAGCCAAGCGGCTGCAGTGCCCTTTGAGCAGGAGCTGCTGAGACGGCAGCAGAGGC	780
<a href="#">NM_001076778</a>	721	.....	780
<a href="#">NM_007177</a>	819	.....	878
8294	781	TGAACCAGCTGGAAAAACCACCAGAGAAGGAAGAGATCACGCCCCGAGTTTATTAAAG	840
<a href="#">NM_001076778</a>	781	.....	840
<a href="#">NM_007177</a>	879	.....	938
8294	841	TCAGGGAAAACCTGCGGAGAATTGCCACACTGACCAGCGAAGAGAGAGCTGTAGGGCC	900
<a href="#">NM_001076778</a>	841	.....	900
<a href="#">NM_007177</a>	939	.....	998
8294	901	AGCTGCCGGGCTCAGGCCACTGCCACCCTGGCCTGGACAGCCTCCTTCAGCCCTTCTGT	960
<a href="#">NM_001076778</a>	901	.....	960
<a href="#">NM_007177</a>	999	.....	1058
8294	961	ACCTGGCAGCCCTGGGCCCCAGGCCCTGGGACGTCGTGATGTTCACCTGCTTCTGTA	1020
<a href="#">NM_001076778</a>	961	.....	1020
<a href="#">NM_007177</a>	1059	.....	1118

8294	1021	GAAATGTGTACCCCAGAGGGCCTGGCTCTCCCCGGGAGGCTGGGGCCCCCTAAGCTCCTA	1080
<a href="#">NM_001076778</a>	1021	.....T.....	1080
<a href="#">NM_007177</a>	1119	.....T.....	1178
8294	1081	GGTTTTCTTCCAAGCACCCAGCCCTCCTGCTCCAAGAGGGATAACCTGCACCCCTCCCT	1140
<a href="#">NM_001076778</a>	1081	.....	1140
<a href="#">NM_007177</a>	1179	.....	1238
8294	1141	GCAAGGGGTTTCAGAGCCAGCACAGGGGCTTTCTCTGGCAGAATTGAGGAGGAAGAGGTG	1200
<a href="#">NM_001076778</a>	1141	.....A.....	1200
<a href="#">NM_007177</a>	1239	.....A.....	1298
8294	1201	GCCCTCTGACTTGACAAGCCTTCTGTTCTGCCAGGCCTTCCCACCAGGAATCTCCGAGG	1260
<a href="#">NM_001076778</a>	1201	.....	1260
<a href="#">NM_007177</a>	1299	.....	1358
8294	1261	CTCCCCAGGGCCCGCTTCTCCGTACACCCAGCTCCTAGGTCTCAGAGAACTCCCCCAC	1320
<a href="#">NM_001076778</a>	1261	.....	1320
<a href="#">NM_007177</a>	1359	.....	1418
8294	1321	CTGTGGTTTTACCTGCAGCCAGCAGAGCTTAGCTTCAAGGACACCTGCCTTCAAAGCCAC	1380
<a href="#">NM_001076778</a>	1321	.....	1380
<a href="#">NM_007177</a>	1419	.....	1478
8294	1381	TGAGGGGAGGAAGGGCAGGGCAGACTGCAGATGGCCTTGTTGCTGGCATCCCGGCCAGGT	1440
<a href="#">NM_001076778</a>	1381	.....	1440
<a href="#">NM_007177</a>	1479	.....	1538
8294	1441	GGGCGGGGACTAACAAAGACAGCTGTTTAGGGTCTTCTCCCCTCACCCATGCTTTCATCA	1500
<a href="#">NM_001076778</a>	1441	.....	1500
<a href="#">NM_007177</a>	1539	.....	1598
8294	1501	TCCCCTCCGCACAGCCTCCCGTCCAGGCCTTCTAACCACACCTACCCAGGGCTGCCGCA	1560
<a href="#">NM_001076778</a>	1501	.....	1560
<a href="#">NM_007177</a>	1599	.....	1658
31117	1561	TTCCTGCACTCAGAAGTCTGCAGCGGTGCCTCACAAACTTGATTGTGCATAAAAAATCACT	1620
<a href="#">NM_001076778</a>	1561	.....	1620
<a href="#">NM_007177</a>	1659	.....	1718
31117	1621	GGGGATCTTGTTAATACAGCTTCTAATTCAATAGATCTGGGAGATCCTGCATTCTAACA	1680
<a href="#">NM_001076778</a>	1621	.....C.....	1680
<a href="#">NM_007177</a>	1719	.....C.....	1778
31117	1681	AGCTCCAGGTAAAGCGGAGGCTGCTGGTGTGAGGACCATGCTGTGAGCAGCAGGGCGAG	1740
<a href="#">NM_001076778</a>	1681	.....	1740
<a href="#">NM_007177</a>	1779	.....	1838
31117	1741	AGTGCCAGGGCTGATATATATTGGAAATATACCCCTGAAGCCATCGCTGGCCCCCACC	1800
<a href="#">NM_001076778</a>	1741	.....	1800
<a href="#">NM_007177</a>	1839	.....	1898
31117	1801	TCCTGTGGACTGATGCCCCAGGGATTCCCACCCCACTTCTGCAACCCAGGTATCCTTCA	1860
<a href="#">NM_001076778</a>	1801	.....	1860
<a href="#">NM_007177</a>	1899	.....	1958
31117	1861	TTATCCACCCCATCCCAGACTCCCACCCAGGGATTGCCCGTGAAGACTTTGGCCTAGCA	1920
<a href="#">NM_001076778</a>	1861	.....	1920
<a href="#">NM_007177</a>	1959	.....	2018
31117	1921	AATTGTGTTGTTATGTGAGTGTGTTTAAATCAGAGATGTATGTGATTGCCAATCTGCA	1980
<a href="#">NM_001076778</a>	1921	.....CA.....	1980
<a href="#">NM_007177</a>	2019	.....CA.....	2078
31117	1981	TTTCTTACCAGTGTGACCACACTGTACGATGCAATTCTAGCCAAAAAAAAAAAAAAAAANN	2040
<a href="#">NM_001076778</a>	1981	.....AA	2040
<a href="#">NM_007177</a>	2079	.....AA	2138
31117	2041	NNNNNNNNNTTTTTTTTTTTTACTTTTTCTAGTCTTATGGAAAGCAAATATACAATG	2100
<a href="#">NM_001076778</a>	2041	AAAAAAAA--.....-	2097
<a href="#">NM_007177</a>	2139	AAAAAAAA--.....-	2195

31117	2101	ATTTTCAGTAGGCTTCTGGAATAGAAACAGTGGTTTGAAGACCCCACTGCCACCTTTATG	2160
<a href="#">NM_001076778</a>	2098	.....	2157
<a href="#">NM_007177</a>	2196	.....	2255
31117	2161	GACTGGCCCCCTTTGAGTCTGAATCCCCGGCCTCTGTACCTGAGACCCAACCCTAGCTG	2220
<a href="#">NM_001076778</a>	2158	.....	2217
<a href="#">NM_007177</a>	2256	.....	2315
31117	2221	GGCCAACTCCAGTGAATTCACCCATTTTCTTCTTCAGAAGGCCTTTCCTGTGTGAGACC	2280
<a href="#">NM_001076778</a>	2218	.....	2277
<a href="#">NM_007177</a>	2316	.....	2375
31117	2281	CACATATTTTAACCTTTTGTCTCTATCCCATTTTTAAAGAATTAGAGAATAAACAGGCC	2340
<a href="#">NM_001076778</a>	2278	.....	2337
<a href="#">NM_007177</a>	2376	.....	2435
31117	2341	TGTTTCTTTTCCCTGAAATCCCTGCCTCTGGCTTCTTAAACCCATCATCTAAGGTGACA	2400
<a href="#">NM_001076778</a>	2338	.....	2397
<a href="#">NM_007177</a>	2436	.....	2495
31117	2401	GAGCAGTGCTGGAATAGCATCTCCTTTCACTTTCCCAAACCTGCCACAGATAGCTGCCAC	2460
<a href="#">NM_001076778</a>	2398	.....	2457
<a href="#">NM_007177</a>	2496	.....	2555
31117	2461	TGGCATGCTCTTTGATTCTGGAAGCAAACGTGGGACTGTCGGAGGAAAGGGATTGTTCT	2520
<a href="#">NM_001076778</a>	2458	.....	2517
<a href="#">NM_007177</a>	2556	.....	2615
31117	2521	GGTCTTACTCATAACTGGGTGGTTTGAGGGTGACTGAAGTCGTCTTTCTGTGTGTGC	2580
<a href="#">NM_001076778</a>	2518	.....	2577
<a href="#">NM_007177</a>	2616	.....	2675
31117	2581	TGCCAGCACAGGGCTGTAAATGCAGATATTGCGCCTGTGTGCGTGTGTATAAGTCAAGCT	2640
<a href="#">NM_001076778</a>	2578	.....	2637
<a href="#">NM_007177</a>	2676	.....	2735
31117	2641	CCAAGAGGCTCCTGAATGTGACTGGCGTGCTGAGAATGTGTTTACGCTGTTTAAATGTCTG	2700
<a href="#">NM_001076778</a>	2638	.....	2697
<a href="#">NM_007177</a>	2736	.....	2795
31117	2701	CCAGGTGAGGGTTACTGAAGATGCACAATCCCTAAAATAAAGATCACCCTTCCCCAA	2760
<a href="#">NM_001076778</a>	2698	.....	2757
<a href="#">NM_007177</a>	2796	.....	2855
31117	2761	AGAAGCAGCCCTCGGGTCCATGTGTTGTTTCAGACATGTGAAGAGAAGCAAGACAGAGGT	2820
<a href="#">NM_001076778</a>	2758	.....	2817
<a href="#">NM_007177</a>	2856	.....	2915
31117	2821	CTCAGATGGACGAGGGCTCTCAAGGGAATGCCTGGGGATTACCCAGTGGTCCCAGAG	2880
<a href="#">NM_001076778</a>	2818	.....	2877
<a href="#">NM_007177</a>	2916	.....	2975
31117	2881	GTGCTCCATGGAGGCAACAAGTCATTCCATGAAGCCCCAGAGGTAGAAGGGACNTCAAGC	2940
<a href="#">NM_001076778</a>	2878	.....C.....	2937
<a href="#">NM_007177</a>	2976	.....C.....	3035
31117	2941	ACCACGCC-TCCNAGGGCAGCCGTGCAGACGACCTTGGTTCACTTTTCAGGGGTCGTCCC	2999
<a href="#">NM_001076778</a>	2938	.....C...-.....	2996
<a href="#">NM_007177</a>	3036	.....C...-.....	3094
31117	3000	AACTCTGTATCTCCAGCCACTCCAAGTGTGGAGGCTGTAAATCCAGATTTTCACTGTTCC	3059
<a href="#">NM_001076778</a>	2997	.....	3056
<a href="#">NM_007177</a>	3095	.....	3154
31117	3060	AGTCTCCTTTGCAGCTTAGGATGGCTATGTGATCAGGTGTGGCCAATGAAATTGAAGAGG	3119
<a href="#">NM_001076778</a>	3057	.....	3116
<a href="#">NM_007177</a>	3155	.....	3214
31117	3120	AAGTCTACCTGGGCTTCTGGGAAAGCTTTTCCAATAAAAGACACAGGCATGGCTAACACC	3179
<a href="#">NM_001076778</a>	3117	.....	3176
<a href="#">NM_007177</a>	3215	.....	3274

31117	3180	TCCCTGGGCCTCTTCTTCTACCTTGATTGAGGGTGTGATGCCTGGAGCCACAGCAGCCA	3239
<a href="#">NM_001076778</a>	3177	.....	3236
<a href="#">NM_007177</a>	3275	.....	3334
31117	3240	CTTTGCTACCATGACAAAAAGCCAAGAGAATCACAGAGTCATTGACCCTATCATTATTT	3299
<a href="#">NM_001076778</a>	3237	.....	3296
<a href="#">NM_007177</a>	3335	.....	3394
31117	3300	CACCAAGCCAATACCAGCCGCCATCCTTCTCCAGAATTCTTGTAATAAAATAAATCCCT	3359
<a href="#">NM_001076778</a>	3297	.....	3356
<a href="#">NM_007177</a>	3395	.....	3454
31117	3360	CTTTGTTT	3367
<a href="#">NM_001076778</a>	3357	.....	3364
<a href="#">NM_007177</a>	3455	.....	3462

**Abb 61: Sequenzabgleich des Inserts des FAM107A-Volllänge-Vektors** mittels „blastn“ („nucleotide blast“ mit der Datenbank „Reference mRNA sequences“ (Wheeler et al., 2000), überprüft am 16.01.2008) Die Abbildung zeigt die Homologien mit den beiden Referenzsequenzen NM\_007177 und NM\_001076778 und die Basenpaarpositionen einzelner Nukleotidaustausche. Das Insert wurde in mehreren Abschnitten sequenziert unter Verwendung folgender Primer: Primer pcDNA3.1-797+, Primer FAM107A-615+, Primer FAM107A-1222-, Primer FAM107A-2008-, Primer FAM107A-2880-, Primer pcDNA3.1-zeo-1275- (Tab C8.7, S.151).



<b>A</b>				
6466	144	CTGCCTCAGGAAGCTTGGCTTCCCCTCCCATGGGGAAGTGCTGGAATCCACTCTTGCCTG	203	
<a href="#">NM_001076778</a>	1	.....	60	
<a href="#">NM_007177</a>	1	.....	60	
6466	204	ACCCTCCCATAAGAAACAAGGGAAATTCTTTACGTGAGCCGCCTTGCTCAGAACAAAGC	263	
<a href="#">NM_001076778</a>	61	.....	120	
<a href="#">NM_007177</a>	61	.....	120	
6466	264	TTGGCGTGTTCCTTATTCTCATCAATCTGACAAAATGGGTATTTATTTGTGCCTCTCAA	323	
<a href="#">NM_001076778</a>	121	.....	180	
<a href="#">NM_007177</a>	121	.....	180	
6466	324	GCGTGTGGCTTGGACATGATGTTCCGCATCGTGGAAGTGGCCGTGCACCAAGTGAATAT	383	
<a href="#">NM_001076778</a>	181	.....	240	
<a href="#">NM_007177</a>	181	.....	240	
6466	384	CTGTTACTATAGTAACAGTTCCTTTTTATTGATACCAGAATAAACAGGAATGCAAAGGCT	443	
<a href="#">NM_001076778</a>	241	.....	300	
<a href="#">NM_007177</a>	241	.....	300	
6466	444	GTCTCACTTGTGGCACATTTAGCAGCCTCCGTTCCCAAGGTTTAAGAACCGCCCTCT	503	
<a href="#">NM_001076778</a>	301	.....G.....	360	
<a href="#">NM_007177</a>	301	.....G.....	360	
6466	504	AGAGGCAGCCCTCCTTGCTAGTCTGGGACTTCCCGGTGGAGTGAGGAACCCAGCAACACG	563	
<a href="#">NM_001076778</a>	361	.....	420	
<a href="#">NM_007177</a>	361	.....	420	
6466	564	CTCCTGACTTCCCTTCCCAAGGACTCGACCTGAGAACCGCCATGTACTCGGAGATCCAGA	623	
<a href="#">NM_001076778</a>	421	.....	480	
<a href="#">NM_007177</a>	421	.....	456	
<a href="#">NM_007177</a>	555	.....	578	
6466	624	GGGAGCGGGCAGACATTGGGGGCCTGATGGCCCGGCCAGAATACAGAGAGTGAATCCGG	683	
<a href="#">NM_001076778</a>	481	.....	540	
<a href="#">NM_007177</a>	579	.....	638	
6466	684	AGCTCATCAAGCCCCAAGAAGCTGCTGAACCCCGTGAANGCCTCTCGGAGTCACCAGGGAG	743	
<a href="#">NM_001076778</a>	541	.....G.....-..	599	
<a href="#">NM_007177</a>	639	.....G.....-..	697	
6466	744	CTCCCCCGGGGAGCTGCTCATGAACCACAGAAAGGGGCCCTTGGGGGTGGA	794	
<a href="#">NM_001076778</a>	600	...A...-.....-.....T.-...	646	
<a href="#">NM_007177</a>	698	...A...-.....-.....T.-...	744	

**Abb 62,A: Sequenzabgleich des Inserts des FAM107A-1,1-IRES-EGFP-Vektors.** Erläuterung siehe Abb 62,B.

<b>B</b>				
2731	116	AGGTGGGAACATCACAGACGTCCCAGGGCCTGGGGCCCAGGGCTGCCAGGTACAGAAGGG	175	
<a href="#">NM_001076778</a>	1011	.....	952	
<a href="#">NM_007177</a>	1109	.....	1050	
2731	176	CTGAAGGAGGCTGTCCAGGCCAGGGTGGGCAGTGGCCTGAGCCCGGCAGCTGGCCCTACA	235	
<a href="#">NM_001076778</a>	951	.....	892	
<a href="#">NM_007177</a>	1049	.....	990	
2731	236	GCTCTCTCTTCGCTGGTCAGTGTGGCAATTCTCCGCAGGTTTTCCCTGACTTTAATAA	295	
<a href="#">NM_001076778</a>	891	.....	832	
<a href="#">NM_007177</a>	989	.....	930	
2731	296	ACTCGGGGCGTGATCCTCTTCTCTCTGGTGGTTTTTCCAGCTGGTTCAGCCTCTGCT	355	
<a href="#">NM_001076778</a>	831	.....	772	
<a href="#">NM_007177</a>	929	.....	870	
2731	356	GCCGTCTCAGCAGCTCCTGCTCAAAGGGGCACTGCAGCCGCTTGGCTTCCAGCTCCTCCT	415	
<a href="#">NM_001076778</a>	771	.....	712	
<a href="#">NM_007177</a>	869	.....	810	
2731	416	TCTTCTTCTTGATGAGCTGGTTCGCCGGCGGTGCTCTAGGACACGCTGCAGCTCTGGCT	475	
<a href="#">NM_001076778</a>	711	.....	652	
<a href="#">NM_007177</a>	809	.....	750	
2731	476	TGCTGTCCACCAAGGCCCTTCTGTGTTTCATGAGCAGCTCCCGGTGGAGCTCCTGGT	535	
<a href="#">NM_001076778</a>	651	.....	592	
<a href="#">NM_007177</a>	749	.....	690	
2731	536	GACTCCGAGAGGCCTTCACGGGGTTCAGCAGCTTCTTGGGCTTGATGAGCTCCGGATTCC	595	
<a href="#">NM_001076778</a>	591	.....	532	
<a href="#">NM_007177</a>	689	.....	630	
2731	536	GACTCCGAGAGGCCTTCACGGGGTTCAGCAGCTTCTTGGGCTTGATGAGCTCCGGATTCC	595	
<a href="#">NM_001076778</a>	591	.....	532	
<a href="#">NM_007177</a>	689	.....	630	
2731	596	ACTCTCTGTATTCTGGCCGGGCCATCAGGCCCCCAATGTCTGCCGCTCCCTCTGGATCT	655	
<a href="#">NM_001076778</a>	531	.....	472	
<a href="#">NM_007177</a>	629	.....	570	
2731	656	CCGAGTACATGGCGTTCTCAGGTCGAGTCTTGGGGAAGGGAAGTCANGAGCGTGTG	715	
<a href="#">NM_001076778</a>	471	.....-.....G.....	414	
<a href="#">NM_007177</a>	569	.....	555	
<a href="#">NM_007177</a>	456	.....-.....G.....	414	
2731	716	CTGGGTTCTCACTCCACCGGGAAGTCCCAGACTAGCAAGGANGGC	761	
<a href="#">NM_001076778</a>	413	.....G...	368	
<a href="#">NM_007177</a>	413	.....G...	368	

**Abb 62,B: Sequenzabgleich des Inserts des FAM107A-1,1-IRES-EGFP-Vektors** mittels „blastn“ („nucleotide blast“ mit der Datenbank „Reference mRNA sequences“ (Wheeler et al., 2000), überprüft am 29.12.2007). Die Abbildung zeigt die Übereinstimmung mit den entsprechenden Bereichen der beiden Referenzsequenzen NM\_007177 und NM\_001076778. Insertsequenz nach Sequenzierung **A**: mit dem Primer pcDNA3.1-797+ (Tab C8.7, S.151); **B**: mit dem reversen Primer pcDNA3.1Zeo(+)-IRES-GFP-1119- (Tab C8.7, S.151). Wie bei dem Vektor pcDNA3.1Zeo(+)-FAM107A-1,1 wurde ein Nukleotidaustausch von G nach A festgestellt. Weitere Abweichungen beruhten auf einer schlechten Qualität der Sequenzdaten und wurden in den Chromatogrammen (ab1-Daten) nicht bestätigt. Die Sequenzierung in der Gegenrichtung bestätigte dies. In diesem Abgleich wird nicht die Sequenz des Vektorgrundgerüsts gezeigt, von der ein Sequenzbereich von 82bp 5' vor dem Insert von der Sequenzierung erfasst wurde und die Insertion in der 5'→3'-Richtung bewies.



<b>A</b>			
17343	125	CGCCATGTACTCGGAGATCCAGAGGGAGCGGGCAGACATTGGGGGCCTGATGGCCCCGGCC	184
<a href="#">NM_007177</a>	556	.....	615
<a href="#">NM_001076778</a>	458	.....	517
17343	185	AGAATACAGAGAGTGGGAATCCGGAGCTCATCAAGCCCAAGAAGCTGCTGAACCCCGTGAA	244
<a href="#">NM_007177</a>	616	.....	675
<a href="#">NM_001076778</a>	518	.....	577
17343	245	GGCCTCTCGGAGTCACCAGGAGCTCCACCGGGAGCTGCTCATGAACCACAGAAGGGGCCT	304
<a href="#">NM_007177</a>	676	.....	735
<a href="#">NM_001076778</a>	578	.....	637
17343	305	TGGTGTGGACAGCAAGCCAGAGCTGCAGCGTGTCTTAGAGCACCGCCGGCGGAACCAGCT	364
<a href="#">NM_007177</a>	736	.....	795
<a href="#">NM_001076778</a>	638	.....	697
17343	365	CATCAAGAAGAAGAAGGAGGAGCTGGAAGCCAAGCGGCTGCAGTGCCCTTTGAGCAGGA	424
<a href="#">NM_007177</a>	796	.....	855
<a href="#">NM_001076778</a>	698	.....	757
17343	425	GCTGCTGAGACGGCAGCAGAGGCTGAACCAGCTGGAAAAACCACCAGAGAAGGAAGAGGA	484
<a href="#">NM_007177</a>	856	.....	915
<a href="#">NM_001076778</a>	758	.....	817
17343	485	TCACGCCCCGAGTTTATTAAAGTCAGGGAAAACCTGCGGAGAATTGCCACACTGACCAG	544
<a href="#">NM_007177</a>	916	.....	975
<a href="#">NM_001076778</a>	818	.....	877
17343	545	CGAAGAGAGAGAGCTGTAGG	564
<a href="#">NM_007177</a>	976	.....	995
<a href="#">NM_001076778</a>	878	.....	897
<b>B</b>			
6004	92	CCTACAGCTCTCTCTCTTCGCTGGTCAGTGTGGCAATTCTCCGAGGTTTTCCCTGACTT	151
<a href="#">NM_007177</a>	995	.....	936
<a href="#">NM_001076778</a>	897	.....	838
6004	152	TAATAAACTCGGGGGCGTGATCCTCTTCCTTCTCTGGTGGTTTTTCCAGCTGGTTCAGCC	211
<a href="#">NM_007177</a>	935	.....	876
<a href="#">NM_001076778</a>	837	.....	778
6004	212	TCTGCTGCCGTCTCAGCAGCTCCTGCTCAAAGGGGCACTGCAGCCGCTTGGCTTCCAGCT	271
<a href="#">NM_007177</a>	875	.....	816
<a href="#">NM_001076778</a>	777	.....	718
6004	272	CCTCCTTCTTCTTCTTGATGAGCTGGTTCGCGCGGCTGCTCTAGGACACGCTGCAGCT	331
<a href="#">NM_007177</a>	815	.....	756
<a href="#">NM_001076778</a>	717	.....	658
6004	332	CTGGCTTGCTGTCCACACCAAGGCCCTTCTGTGGTTCATGAGCAGCTCCCGGTGGAGCT	391
<a href="#">NM_007177</a>	755	.....	696
<a href="#">NM_001076778</a>	657	.....	598
6004	392	CCTGGTGACTCCGAGAGGCCTTCACGGGGTTCAGCAGCTTCTTGGGCTTGATGAGCTCCG	451
<a href="#">NM_007177</a>	695	.....	636
<a href="#">NM_001076778</a>	597	.....	538
6004	452	GATTCCACTCTCTGTATTCTGGCCGGGCCATCAGGCCCAATGTCTGCCCGCTCCCTCT	511
<a href="#">NM_007177</a>	635	.....	576
<a href="#">NM_001076778</a>	537	.....	478
6004	512	GGATCTCCGAGTACATGGCG	531
<a href="#">NM_007177</a>	575	.....	556
<a href="#">NM_001076778</a>	477	.....	458

**Abb 63: Sequenzabgleich des Inserts des FAM107A-ORF-IRES-EGFP-Vektors** mittels „blastn“ („nucleotide blast“ mit der Datenbank „Reference mRNA sequences“ (Wheeler et al., 2000), überprüft am 30.12.2007). Die Abbildung zeigt eine 100%ige Übereinstimmung mit den ORF-Bereichen der beiden Referenzsequenzen NM\_007177 und NM\_001076778. A: mit dem Primer pcDNA3.1-797+ (Tab C8.7, S.151) sequenziert, B: mit dem reversen Primer pcDNA3.1Zeo(+)IRES-GFP-1119 (Tab C8.7, S.151) sequenziert.

13336	97	CGCCATGTACTCGGAGATCCAGAGGGAGCGGGCAGACATTGGGGGCCTGATGGCCCGGCC	156
NM_007177	556	.....	615
NM_001076778	458	.....	517
13336	157	AGAATACAGAGAGTGGAATCCGGAGCTCATCAAGCCCAAGAAGCTGCTGAACCCCGTGAA	216
NM_007177	616	.....	675
NM_001076778	518	.....	577
13336	217	GGCCTCTCGGAGTCACCAGGAGCTCCACCGGGAGCTGCTCATGAACCACAGAAGGGGCCT	276
NM_007177	676	.....	735
NM_001076778	578	.....	637
13336	277	TGGTGTGGACAGCAAGCCAGAGCTGCAGCGTGTCTTAGAGCACCGCCGGCGGAACCAGCT	336
NM_007177	736	.....	795
NM_001076778	638	.....	697
13336	337	CATCAAGAAGAAGAAGGAGGAGCTGGAAGCCAAGCGGCTGCAGTGCCCCCTTTGAGCAGGA	396
NM_007177	796	.....	855
NM_001076778	698	.....	757
13336	397	GCTGCTGAGACGGCAGCAGAGGCTGAACCAGCTGGAAAAACCACCAGAGAAGGAAGGAGG	456
NM_007177	856	.....	914
NM_001076778	758	.....	816
13336	457	ATCACGCC	464
NM_007177	915	.....	922
NM_001076778	817	.....	824

**Abb 64: Sequenzabgleich des Insertsequenzabschnittes in genomischer DNA von H08 mit „blastn“ („nucleotide blast“ mit der Datenbank „Reference mRNA sequences“ (Wheeler et al., 2000), überprüft am 30.12.2007): Die Sequenzierung erfolgte mit dem Primer pcDNA3.1-797+ (Tab C8.7, S.151).**

20556	101	CGCCATGTACTCGGAGATCCAGAGGGAGCGGGCAGACATTGGGGGCCTGATGGCCCGGCC	160
NM_007177	556	.....	615
NM_001076778	458	.....	517
20556	161	AGAATACAGAGAGTGGAATCCGGAGCTCATCAAGCCCAAGAAGCTGCTGAACCCCGTGAA	220
NM_007177	616	.....	675
NM_001076778	518	.....	577
20556	221	GGCCTCTCGGAGTCACCAGGAGCTCCACCGGGAGCTGCTCATGAACCACAGAAGGGGCCT	280
NM_007177	676	.....	735
NM_001076778	578	.....	637
20556	281	TGGTGTGGACAGCAAGCCAGAGCTGCAGCGTGTCTTAGAGCACCGCCGGCGGAACCAGCT	340
NM_007177	736	.....	795
NM_001076778	638	.....	697
20556	341	CATCAAGAAGAAGAAGGAGGAGCTGGAAGCCAAGCGGCTGCAGTGCCCCCTTTGAGCAGGA	400
NM_007177	796	.....	855
NM_001076778	698	.....	757
20556	401	GCTGCTGAGACGGCAGCAGAGGCTGAACCAGCTGGAAAAACCACCAGAGAAGGAAGAGGA	460
NM_007177	856	.....	915
NM_001076778	758	.....	817
20556	461	TCACGCCCCGAGTTTATTAAAGTCAGGGAAAACCTGCGGAGAATTGCCACACTGACCAG	520
NM_007177	916	.....	975
NM_001076778	818	.....	877
20556	521	CGAAGAGAGAGAGCTGTAGG	540
NM_007177	976	.....	995
NM_001076778	878	.....	897

**Abb 65: Sequenzabgleich eines Sequenzabschnittes genomischer DNA von H011 mit „blastn“ („nucleotide blast“ mit der Datenbank „Reference mRNA sequences“ (Wheeler et al., 2000) überprüft am 30.12.2007). Die Sequenzierung erfolgte mit dem Primer pcDNA3.1-797+ (Tab C8.7, S.151).**

11540	107	CGCCATGTACTCGGAGATCCAGAGGGAGCGGGCAGACATTGGGGGCCTGATGGCCCGGCC	166
<a href="#">NM_007177</a>	556	.....	615
<a href="#">NM_001076778</a>	458	.....	517
11540	167	AGAATACAGAGAGTGGAATCCGGAGCTCATCAAGCCCAAGAAGCTGCTGAACCCCGTGAA	226
<a href="#">NM_007177</a>	616	.....	675
<a href="#">NM_001076778</a>	518	.....	577
11540	227	GGCCTCTCGGAGTCACCAGGAGCTCCACCGGGAGCTGCTCATGAACCACAGAAGGGGCCT	286
<a href="#">NM_007177</a>	676	.....	735
<a href="#">NM_001076778</a>	578	.....	637
11540	287	TGGTGTGGACAGCAAGCCAGAGCTGCAGCGTGTCTAGAGCACCGCCGGCGGAACCAGCT	346
<a href="#">NM_007177</a>	736	.....	795
<a href="#">NM_001076778</a>	638	.....	697
11540	347	CATCAAGAAGAAGAAGGAGGAGCTGGAAGCCAAGCGGCTGCAGTGCCCTTTGAGCAGGA	406
<a href="#">NM_007177</a>	796	.....	855
<a href="#">NM_001076778</a>	698	.....	757
11540	407	GCTGCTGAGACGGCAGCAGAGGCTGAACCAGCTGGAAAAACCACCAGAGAAGGAAGAGGA	466
<a href="#">NM_007177</a>	856	.....	915
<a href="#">NM_001076778</a>	758	.....	817
11540	467	TCACGCCCCGAGTTTATTAAAGTCAGGGAAAACCTGCGGAGAATTGCCACACTGACCAG	526
<a href="#">NM_007177</a>	916	.....	975
<a href="#">NM_001076778</a>	818	.....	877
11540	527	CGAAGAGAGAGAGCTGTAGG	546
<a href="#">NM_007177</a>	976	.....	995
<a href="#">NM_001076778</a>	878	.....	897

**Abb 66: Sequenzabgleich eines Sequenzabschnittes genomischer DNA von R012 mit „blastn“** („nucleotide blast“ mit der Datenbank „Reference mRNA sequences“ (Wheeler et al., 2000), überprüft am 30.12.2007). Die Sequenzierung erfolgte mit dem Primer pcDNA3.1-797+ (Tab C8.7, S.151).

GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCTATGGTCGACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTG  
 TGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTT  
 AGGCGTTTTCGCGTGTCTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCAT  
 TAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTGACGTC  
 AATAATGACGTATGTTCCCATATAGTAAACGCCAATAGGAGCTTCCATTGACGTCATGGTGAGCTATTTACGGTAAACTGCCCATTTGGCAGTA  
 CATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGG  
 ACTTTCCTACTTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATTGGTGATGCGGTTTGGCAGTACATCAATGGCGGTGATAGCGGTT  
 TGACTCACGGGGATTTCGAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAAC  
 AACTCCGCCCCATGACGCAAAATGGCGGTAGGCGGTGACGGTGGGAGGTCATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCCACTGCTT  
 ACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGAGACCCAAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGT  
 CCAGTGTGGTGGAAATCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCAATTCGCCCTTGGGTGACATCCGCCCTCTCCCTcccccccccccta  
 acgttaactggcgaagcgcgttgaataaaggccggtgtgcgtttgtctatatgttatttccaccatattgcccgtcttttggcaatgtgagggc  
 ccggaacactggccctgtcttcttgaacgagcattctctaggggtcttccctctcgccaaaggaaatgcaaggtctgttgaatgtcgttgaaggaa  
 gcaagtctctgtgaagcttcttgaagacaaacaacgtctgttagcgacccttgcaggcagcgggaacccccccacctggcgacaggtgcctctgcg  
 gccaaaagccacgtgtataagatacacctgcgaaggcggcacaacccccagtgccacgttgtgagttggatagttgtggaagagtcgaatggct  
 ctctcaagcgtattcaacaagggtgaaggatgccagaaggtacccattgtatgggatctgatctggggcctcggtacacatgctttaca  
 tgtgtttagtgcaggttaaaaaaacgtctaggccccccgaaccacggggagcgtggtttcttcttgaaaaacacgatataaTATGGCCACCAAC  
 atcgtgtagcaagggcgagggagctgttccacgggtgtgcccactcctggtcgagctggacggcgacgtaaaacggccacgaagttcagcgtgtccg  
 gcgagggcgagggcgatgccactacggcaagctgacctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtgccctggccaccctcgtgac  
 caccctgacctacggcgtgcagtgcttcagcgcctaccccagaccatgaagcagcagcacttctcaagtccgcatgcccgaaaggtacgtc  
 caggagcgcaccatcttctcaaggacgagcgaactacaagaccgcgcgcaggtgaagttcgagggcgacacctggtgaacgcgactcgagc  
 tgaagggtcagcactcaaggagggcagcgaacatcctgggacgaagctggagttacaaactacaacagccacaacgtctctatcatggtgcgcaaa  
 gcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccggcacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccactaccagcagaacaccccc  
 atcgcgacggcccgctgctgctgccgcacaacactacctgagcaccagctcgccctgagcaaaagaccccaacgagaagcgatcacatgtg  
 tctctggagttcgtgacgcgcgcgggatcactctcggtacgtggaacgtgtacaagTaaGCGGCCCGCCCTCGAGTCTAGAGGCGCCGTTTA  
 AACCCGCTGATCAGCTCGACTGTGCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGACCTTGAAGGTGCCACT  
 CCCACTGTCTTTCTTAATAAAATGAGGAAATTCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCTATTCTATCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCA  
 AGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTCTGAGGCGGAAAGAACAGCTGGGGCTCTAGGGG  
 GTATCCCGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGGGGTGTGGTGTAGCGCGACGCTGACCGTACACTTGGCAGCGCCCTAGCGCCC  
 GCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCTTCTCGCCAGCTTCGCGCGCTTTCGCCGTAAGCTCTAAATCGGGGACATCCCTTTAGGGTTCCGATTTA  
 GTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTACGTTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTCGCCCTTTGAC  
 GTTGGAGTCCAGTCTTCTTAATAGTGGACTCTGTGTTCCAAACTGGAAACAACATCAACCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTATAAGGGATT  
 TTGGGGATTTCGGCTTATGGTTAAAAATGAGTGAATTAACAAAAATTAACGCAATTAATCTGTGGAATGTGTGCAGTTAGGGTGTGG  
 AAAGTCCCGAGGCTCCCGAGGCGAGGAAGTATGCAAGCTATGCCATTCAATTAGTCAGCAACCCAGGTGTGGAAGTCCCAAGGCTCCCGAGC  
 AGGCAGAAGTATGCAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTC  
 GCCCATCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTATTTATGACGAGGCCGAGGCGCCCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAG  
 GCTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCGGAGCTGTGATATCCATTTCGGATCTGATCAGCAGCTGTTGACAATTAATCATCG  
 GCATAGTATATCGCATAGTATAAATACGACAAGTGAAGAACTAAACCATGGCCAAAGTTGACCAAGTGCCTTCCGGTGTCCGGTGCAGCG  
 TCGCCGAGCGGTGAGTCTTGACCGACCGGCTCGGGTCTCCCGGACTCTCGTGAGGACGACTTCGCCGGTGTGGTCCGGGACGACGTGAC  
 CCGTGTTCATCAGCGCGTCCAGGACAGGTGGTCCCGGACAACACCTTGGCTGGGTGTGGGTGCGCGGCTTGGACGAGCTGTACGCCAGTGG  
 TCGGAGGTGCTGCCAGAACTCCGGGACGCTCCGGGCGGCCATGACCGAGATCGCGGAGCAGCCGTGGGGCGGGAGTTCGCCCTGCGCG  
 ACCCGCGCGCAACTCGCTGCATCTCTGCGCGGAGGAGGAGCTGACAGCTGTACGAGATTTCGATTCCACCGCCGCTCTCATGAAGGTT  
 GGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCGGCTGGATGATCTCCAGCGCGGGATCTCATGCTGGAGTCTTCGCCACCCCACTTGTTTTATT  
 GCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATACAAATTCACAAATAAAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAAC  
 TCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAATTTGTTA  
 TCCGCTCCCAATGCTTAACACAAACATACGAGCGGGAAGTGAAGTGAAGGCTGGGGTGCCCTAATGAGTGAGTCACTCAATGAATGCGTTG  
 CGCTCACTGCCGCTTTCAGTCCGGAACCTGTCGTGCCAGTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGGCTATTGGGC  
 GCTCTTCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGTTGGGTGCGCGGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATC  
 CACAGAATCAGGGGATACGCAAGGAAGAAATGTGAGCAAAAGGCGCAGCAAAAGGCGCAGGAACCGTAAAAAGGCGCGTGTGTCGCGCTTTTC  
 CATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATACAAAAATCAGGCTCAAGTCAGAGTGGCGAAACCCGACAGGACTAAGAGTACGAGGCTTTTC  
 CCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCGACCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCTCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTC  
 TCAATGCTCAGCTGTAGGTATCTAGTTCGGTGTAGGTGCTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGCTTCAGCCCGACCGCTGC  
 GCCTTATCCGTTAATCTCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGA  
 GGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGCTACAGTACAGTAAGGACAGTATTGGTATCTCGCTCTGCTGAAGCC  
 AGTTACCTTCGGAAGAGTGGTAGCTCTTGATCCGCAACAAACACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACG  
 CGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAACTCAGTTAAGGGATTTTGGTCA  
 TGAGATTATCAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTAAATTAATAAAGTATTAAATCAATCTAAAGTATATAGTAACTTGGTCTGA  
 CAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGACCTATCTCAGCGATGTGCTATTTCGTTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCGCTCGTGTAGATAACT  
 ACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTATCAGCAATAAACACG  
 CAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTC  
 GCCAGTTAATAGTTTGGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCAATCAGCTCCGTTCC  
 CAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTAGTCTCCTTCGCTCCTCCGATCGTTGTAGAAAGTAAGTTGGCC  
 CAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATCTCTTACTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAAC  
 CAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAA  
 GTGCTCATCATTGGAACCGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCA  
 ACTGATCTCAGCATCTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAAGGCAAGGCAAAATGCGCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACG  
 GAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTGAATGTATT  
 TAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAAGTGCCACCTGACGTC

**Abb 67: Sequenz des Vektors pcDNA3.1Zeo(+)-IRES-EGFP, Länge: 6358bp, (Bardenheuer, Universitätsklinikum Essen). Die gelb markierte Sequenz zeigt die IRES-Sequenz, die türkis markierte die EGFP-ORF-Sequenz mit rot markiertem Start- und Stop-Codon.**

## Anhang F: Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name:	Ursula Maria Jünemann
Anschrift:	Duisburger Str. 329 45478 Mülheim an der Ruhr Telefon: 0208/3859457 e-mail: <a href="mailto:Ursula.Juenemann@uni-duisburg-essen.de">Ursula.Juenemann@uni-duisburg-essen.de</a>
Geburtsdatum und -ort:	26.03.1966 in Münster/Westfalen
Staatsangehörigkeit:	deutsch

### Schulische Ausbildung

1972-1976	Michael-Grundschule in Münster
1976-1985	Marienschule in Münster, Gymnasium, Abschluss: Abitur

### Studium

WS1985/86-WS1986/87	Bayerische Julius Maximilians-Universität Würzburg Anglistik und Geschichte
SS1987-WS1987/88	Westfälische Wilhelms-Universität Münster Französisch und Latein. Philologie
SS1988-SS1993	Westfälische Wilhelms-Universität Münster Pharmazie
Juni 1993	Pharmazeutische Prüfung (1,85)
Juni 1993	Approbation als Apothekerin

### Praktika

1992-1993	Prakt. Jahr, 1. Halbjahr: Annette-Apotheke, Münster Prakt. Jahr, 2. Halbjahr: Kosmas-Apotheke, Angelnmodde
ab 31.10.2003 -31.06.2008	Praktikantin Innere Klinik, Tumorforschung, Labor Prof. Opalka

### Beruflicher Werdegang

Sommer 1993	Vertretungen in öffentlichen Apotheken
01.10.1993-31.03.1995	angestellte Apothekerin in der Thomas Apotheke, Mülheim a. d. Ruhr
Seit 01.04.1995	Tätigkeit als Apothekerin in der Hufeland-Apotheke, Essen
21.05.2001 -20.05.2002	Wissenschaftliche Hilfskraft, Innere Klinik, Tumorforschung, Labor Prof. Opalka

### Berufliche Weiterbildung

1993-1997	Weiterbildung zur Fachapothekerin für Allgemein- Pharmazie (vorher: Offizin-Pharmazie)
1997	Weiterbildung zur Fachapothekerin für Gesundheitsberatung und Prävention (vorher: Gesundheitsberatung)

Essen, September 2008

U. M. Jünemann

Ursula Maria Jünemann

**Anhang G, Erklärungen****Erklärung:**

Hiermit erkläre ich gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat, dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „FAM107A/DRR1/TU3A - Systematische Analysen zur möglichen Funktion eines Gens“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Ursula Maria Jünemann befürworte.

Essen, den 01.09.2008

B. Opalka

*Prof. Dr. B. Opalka***Erklärung:**

Hiermit erkläre ich gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 01.09.2008

U. M. Jünemann

*Ursula Maria Jünemann***Erklärung:**

Hiermit erkläre ich gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat, dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 01.09.2008

U. M. Jünemann

*Ursula Maria Jünemann*